



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS-FISIOLOGIA
ANIMAL COMPARADA



**Investigação da quebra endossimbiótica entre anêmona do
mar *Bunodosoma cangicum* alga simbiótica: um modelo para
o estudo do branqueamento.**

Marcelo Tavares Alalan

Dissertação apresentada no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em Fisiologia Animal Comparada.

Orientadora: Robert Tew Boyle

Rio Grande
Março, 2016.

“Dois ratos caíram em um pote de nata, o primeiro rato desistiu e se afogou, o segundo rato se esforçou tanto que transformou a nata em manteiga e saiu.”

Autor desconhecido

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, independente dos dias em que tive pouca ou muita fé, ou nas horas de descrença, hoje tenho absoluta certeza de que em nenhum momento fui esquecido ou deixado de lado por ele, sinto que fui abençoado em todo meu caminho percorrido. Agradeço a minha mãe Mare, ao meu pai Cleomar, minha irmã Caroline e ao meu sobrinho Anderson. Graças a eles, fosse qual fosse a situação, tive apoio e neles um motivo, para que nas horas, de dificuldade conseguisse reagir. Um agradecimento mais que merecido a minha namorada Karen, que se propôs nos piores momentos a ser mais que uma namorada, mas sim uma verdadeira amiga e parceira. Um agradecimento geral e especial a todo ICB, seja colegas, professores ou funcionários no geral. Graças a sua estrutura e pessoas competentes que o constituem, pude aprender muito e me desenvolver academicamente. Agradeço a FURG e ao Programa de Pós-graduação de Ciências Fisiológicas – FAC pela oportunidade de realizar o mestrado, pela excelente estrutura da Universidade Federal do Rio Grande e pela bolsa concedida pelas CAPES. Agradeço ao Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL), por toda estrutura de ponta disponibilizada durante o meu mestrado. Um agradecimento especial aos meus companheiros desde a graduação Claudio Bastos e Marcelo Estrella Josende. Neles tive mais que amigos, o Claudio foi como um irmão, e o Marcelo, foi praticamente um tutor, com que aprendi muito como pessoa. Agradeço aos dois por essa parceria de sucesso desde que começamos nossa caminhada no mundo acadêmico, tenho certeza que essa amizade será levada pra vida toda. Também deixo meu muito obrigado a todas as pessoas não citadas, mas que acreditaram e me presentearam com sua amizade durante essa jornada. Agradeço em especial a banca composta pelo Professor Doutor Adalto Bianchini, pela Professora Doutora Carolina Arruda de Oliveira Freire e pelo meu orientador Professor Doutor Robert Tew Boyle por aceitar o convite me honrarem com sua contribuição. Muito obrigado por compartilharem sua experiência e conhecimento com esse trabalho. Um obrigado especial a Professora Doutora Marta Marques de Souza, que sempre gentilmente se pôs a disposição para dar suporte sempre que necessário. Por último, mas talvez a quem deva mais agradecer, ao meu orientador Professor Doutor Robert Tew Boyle, por toda orientação, e por me apoiar em momentos extremamente delicados nas quais foram difíceis superar. Muito obrigado por me orientar, a mais de cinco anos, incluindo a graduação. Eu não poderia ter tido melhor orientador.

Sumário

Resumo Geral.....	6
Palavras Chave.....	7
Introdução Geral.....	Erro! Indicador não definido.
Branqueamento	Erro! Indicador não definido.
Importância ecológica do branqueamento.....	Erro! Indicador não definido.
Mecanismos do branqueamento.....	Erro! Indicador não definido.
Base celular da simbiose entre cnidários e dinoflagelados	Erro! Indicador não definido.
Estresse oxidativo e temperatura.....	Erro! Indicador não definido.
Sinalizadores	Erro! Indicador não definido.
Anêmona-do-mar <i>Bunodosoma cangicum</i>	Erro! Indicador não definido.
Bibliografia Introdução Geral	Erro! Indicador não definido.
Objetivos	20
Objetivo Geral.....	20
Objetivos Específicos.....	21
Manuscrito.....	21
An inquiry into the molecular pathways which may signal the disruption of the symbiosis between algae and anemone in the tentacles of <i>Bunodosoma cangicum</i>	21
Abstract	22
Key words: coral bleaching, molecular signaling, symbiosis	22
1. Introduction.....	22
2. Method	24
2.1 Collection, maintenance and acclimatization of animals	24

2.2 Determination of the Relative Symbiotic Viability (RSV) Index	25
2.3 Laser scanning confocal microscopy	25
2.4 Experimental design (temperature stress)	26
2.5 Experimental design (second messenger signaling).....	27
2.6 Statistical Analyses	28
3. Results	28
4. Discussion	41
5. Bibliography.....	42
Discussão Geral.....	48
Conclusão Geral.....	71
Bibliografia	71

Resumo Geral

Simbiose entre uma variedade de invertebrados marinhos, incluindo cnidários, e algas fotossintéticas são comuns no ambiente marinho (Liñán-Cabello et al. 2010). Um dos fenômenos em que essas consequências são mais aparentes, é o branqueamento. O branqueamento de corais geralmente é definido como um declínio na produção de alga simbiótica, uma redução no teor de pigmentos fotossintéticos das algas ou ambos (A. E. Douglas 2003). Nas últimas décadas cada vez mais o termo branqueamento, tem estado nas pautas das principais instituições acadêmicas e científicas responsáveis por estudar a biota marinha, e toda consequência que esse fenômeno tende a ocasionar tanto no ambiente marinho, quanto os mais diversos grupos que tem relação ecológica com os organismos impactados. Inúmeros são os fatores responsáveis por tal fenômeno, variando do aumento da temperatura relacionada ao aquecimento global, acidificação dos oceanos até o aumento gradativos da poluição derivadas de atividades antropogênicas (Downs et al. 2002; A. E. Douglas 2003). Este trabalho teve como objetivo estudar os processos envolvidos e algumas vias que ocasionam o branqueamento que ocorre em cnidários, em decorrência da quebra da endossimbiose entre *Bunodosoma cangicum* e alga simbiótica. Através da análise do efeito do aumento da temperatura da água, da resposta a um aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio; modelo usado para compreender melhor o papel do estresse oxidativo, e da melhor compreensão de vias sinalizadoras envolvidas na homeostase do cálcio, adesão celular e resposta apoptótica, todos estes processos envolvidos, usado como modelo da quebra endossimbiótica entre cnidários e algas simbióticas, evento esse conhecido como branqueamento. Através de extração e isolamento das algas simbióticas, quantificação de proteínas totais e área estimadas das algas, e, relação entre carotenoides e clorofila

através de microscopia confocal foi possível determinar se houve uma diminuição simbiótica ou não, nas diferentes hipóteses testadas. Nossos resultados mostram que o aumento da temperatura pode causar estresse oxidativo, acarretando na quebra da simbiose entre cnidário e alga. Também foi visto que o aumento de temperatura pode interferir na adesão celular, através de uma desestabilização na homeostase do cálcio levando ao branqueamento. Os resultados mostram que a cafeína pode induzir liberação de cálcio, este que, induz a produção de óxido nítrico que pode mediar apoptose e induzir uma resposta de branqueamento. O óxido nítrico também pode interferir no segundo mensageiro cGMP, este, afeta adesão celular. Todas essas vias podem levar ao branqueamento.

Palavras Chave

cnidários, branqueamento de corais, *B. cangicum*, endossimbiose, sinalização molecular.

Introdução geral:

Simbiose entre uma variedade de invertebrados marinhos, incluindo cnidários, e algas fotossintéticas são comuns no ambiente marinho.¹ Baseia-se na relação de mutualismo entre hospedeiros invertebrados e seus dinoflagelados fotossintetizantes do gênero *Symbiodinium*.² As relações ecológicas mais significativas deste mutualismo se dá entre corais e anêmonas do mar que juntos formam a fundação estrutural e o ambiente do ecossistema de recifes de corais.³ Nas associações entre cnidários e o gênero *Symbiodinium*, as algas fotossintéticas então localizadas em vacúolos derivados do

hospedeiro (no interior das células gastrodermais do hospedeiro). Uma vez que em simbiose, simbiontes fornecem até 95% dos seus produtos, oriundos da fotossíntese (glicerol, glicose, aminoácidos ou lipídeos) para o hospedeiro, contribuindo maciçamente para sua demanda energética. Em troca, o hospedeiro assegura proteção à alga simbiote e fornece uma fonte de nutrientes inorgânicos como gás carbônico, amoníaco e fosfato.^{3,4}

O branqueamento de corais geralmente é definido como um declínio na densidade de algas simbióticas, redução no teor de pigmentos fotossintéticos das algas simbiontes ou ambos. Está diminuição parcial ou total, na densidade da alga, acarreta perda de cor, devido a pigmentação conferida pela alga. O termo “ branqueamento de corais” é um equívoco. O branqueamento não é restrito aos corais, mas exibido por todos os animais em simbiose com dinoflagelados. Organismos recifais (foraminíferos, esponjas, hidrocorais, anêmonas, alcionários, corais moles, zoantídeos e os moluscos tridactinídeos) juntamente com os corais escleractínios, possuem endo-simbiontes. Algas do gênero *Symbiodinium* são as mais comuns a fazerem relações com cnidários, mas não são as únicas. As algas simbiontes do gênero *Symbiodinium* são popularmente chamadas de zooxantelas devida a sua cor marrom e amarelada, em decorrência da presença de clorofila além de vários carotenoides, principalmente pirimidinas.^{2,5} Quanto mais intenso e duradouro for o evento estressante, maior a chance do hospedeiro adoecer e morrer.⁶

Nas últimas década cada vez mais o termo branqueamento, tem estado nas pautas das principais instituições acadêmicas e científicas responsáveis por estudar a biota marinha, e toda consequência que esse fenômeno tende a impactar tanto o ambiente marinho, quanto os mais diversos grupos que tem relação ecológica com os

organismos impactados. Inúmeros são os fatores responsáveis por tal fenômeno, variando do aumento da temperatura relacionada ao aquecimento global, acidificação dos oceanos, e o aumento gradativos da poluição derivadas de atividades antropogênicas.^{2,7,8}

Os representantes mais famosos em evidencia atualmente são os corais que possuem esqueleto de calcário. Muito pela sua importância econômica com a população humana, milhares de pessoas no mundo todo se beneficiam direta ou indiretamente dos recifes de corais. A fundação dos recifes de coral é uma das mais diversificadas e produtivas atividades encontradas nos ecossistemas marinhos.⁹ E também por que os recifes abrigam e interagem com várias espécies marinhas. A simbiose facilita a deposição do esqueleto coralíneo uma vez que os corais privados de suas algas ou mantidos na escuridão depositam carbonato de cálcio numa velocidade muito menor do que aquela dos corais que vivem em condições normais.¹⁰ Os eventos de branqueamento de coral durante a década de 80 e início dos anos 90, mostraram um poderoso vigor seletivo sobre todas as reservas recifais de todo o planeta.¹¹ Dentre os vários efeitos, imediatos, oriundos deste distúrbio, destacam-se: (1) o declínio na densidade dos endo-simbiontes, (2) a perda dos seus pigmentos fotossintéticos, (3) o aumento na taxa respiratória dos corais, e (4) o declínio nos níveis de proteínas, lipídios e carboidratos das colônias escleractínias, (5) deficiência nutricional, (6) mortalidade, (7) declínios em sistemas de corais inteiros. Pode-se ainda adicionar outros três tipos de respostas não letais, que a longo prazo, poderão apresentar efeitos importantes, tais como: (8) a redução da taxa de crescimento e de calcificação dos corais; (9) o seu enfraquecimento reprodutivo e (10) a necrose dos seus tecidos.^{11,12,13}

A The Nature Conservancy (TNC) já mostrou que os corais também funcionam como “escudo” contra a elevação do nível dos mares e outros efeitos do aquecimento global. Estas estruturas de calcário e matéria orgânica reduzem o impacto das ondas nas áreas litorâneas em 97%. Somente no Brasil, são 8 milhões de pessoas protegidas. Em todo mundo, são cerca de 200 milhões de pessoas em 80 países. Todavia, concomitante aos distúrbios de branqueamento de corais e organismos que realizam endo-simbiose com algas fotossintetizantes, também ocorrem extraordinários – embora não necessariamente relacionados - distúrbios de outros organismos marinhos, como por exemplo a mortalidade em massa dos ouriços marinhos e a síndrome ulcerativa dos peixes. Além disso, até os táxons terrestres mais importantes como os anfíbios e os fungos, têm demonstrado um pronunciado declínio de suas populações nos anos recentes. Finalmente, alguns destes distúrbios de grande escala (ulcerações e declínio dos anfíbios) coincidem com o estresse dos fatores ambientais naturais, extremos ou marginais, e com a preocupação acerca das mudanças globais.¹⁴,¹⁵,¹⁶,¹⁷ Algumas espécies de Anêmonas do mar também possuem relação simbiótica, e por tanto também podem vir a sofrer branqueamento. Anêmonas são um grupo grande de cnidários presentes em todo mundo, e no Brasil não é diferente, ao longo de nossa vasta costa litorânea, podemos encontrar anêmonas do mar. Portanto além do prejuízo aos corais, um outro grande grupo é afetado, isso só potencializa o dano ecológico, sem contar todos os organismos que também interagem com as anêmonas.

A NOAA (Serviço Oceanográfico e Atmosférico do governo dos Estados Unidos) já alerta a costa brasileira como potencial região em que o evento de branqueamento venha crescer nos próximos anos. Pelo que se tem de dados e pesquisas sobre o assunto, não há nenhum outro método conhecido para impedir o branqueamento, a não ser eliminando as causas que desencadeiam o processo. Por isso a

necessidade de cada vez mais pesquisas, dados, prevenção e modelos que permitam maior compreensão do assunto. Além disso, os distúrbios de branqueamento não estão confinados apenas aos endo-simbiontes, mas afeta também numerosas outras espécies (desprovidas desta relação simbiótica) que dependem dos corais vivos para abrigo, alimentação e outros requisitos. Sem dúvida alguma, se o branqueamento é causado pelas mudanças físico-químicas da água do mar e da atmosfera, então afeta e interfere na alimentação, crescimento, reprodução, desenvolvimento larval e o sucesso do recrutamento, de muitos outros táxons recifais.¹¹

Base celular da simbiose entre cnidários e dinoflagelados

A relação entre Cnidários e dinoflagelados é centrada em torno da troca nutricional entre ambos os presentes nessa relação. Os simbiotes dinoflagelados transcolam a maior parte do seu carbono fixado pela fotossíntese para o hospedeiro, incluído também um fluxo de Azoto inorgânico, fósforo e carbono para o hospedeiro, em troca de um refúgio seguro, além de um bom posicionamento para captação de luz.

18, 19

Tal relação celular tão íntima envolve uma regulação fina e precisa que permite a manutenção da interação. Esta comunicação entre partes inclui: (1) capacidade de reconhecimento das partes da simbiose, (2) capacidade dos simbiotes para colonizar células hospedeiras, (3) capacidade do hospedeiro de tolerar a presença do simbiote, (4) adaptações e capacidade de realizar as trocas mútuas e o intercâmbio nutricional da relação. Segundo Weis³ o grau de informação e compressão em torno das bases celulares envolvendo o branqueamento pode ser analisado em três graus de conhecimento.

- Maior parte e muito de tudo já documentado pesquisado até hoje, em torno do branqueamento é sobre os estágios iniciais do branqueamento e a produção de ROS no simbionte.
- Menor parte e área mais carente de pesquisa e dados sobre o branqueamento é sobre a cascata de sinalização que desencadeia o branqueamento no cnidário.
- Em um nível intermediário de conhecimento e interesse em pesquisas recentes está relacionada ao estágio final dos mecanismos celulares, que resultam na perda do simbionte.

Mecanismos do branqueamento

A informação sobre os mecanismos de branqueamento é fragmentada, como peças de um grande quebra cabeça que descreve uma imagem desconhecida.² Essas peças incluem, (1) dano e redução da proteína D1 do fotossistema II, centro de reação das células da alga. E a interrupção do ciclo de Calvin responsável por mediar a fixação fotossintética do dióxido de carbono, cada um dos quais tem sido sugerido a contribuir para os mecanismo de branqueamento em resposta a elevadas temperaturas e elevadas irradiações, (2) inibição da fotossíntese em resposta a uma toxina produzida pelo patógeno *Vibrioshiloi*, (3) alterações nos padrões de fosforilação de proteínas celulares que conduzem ao sintomas na quebra da endossimbiose, (4) morte celular por necrose e apoptose. Esses processos não são mutualmente exclusivos, podendo ocorrer sequencialmente ou em paralelo. Pesquisas futuras não só devem identificar e caracterizar estes e outros componentes dos mecanismos de branqueamento, mas também elucidar suas interações.^{5, 20, 21, 22, 23}

Estresse oxidativo e temperatura

A alga simbiote pode apresentar altas taxas de fotossíntese em ambientes de alta luminosidade, como por exemplo corais de águas claras de recifes tropicais e anêmonas presentes em costões rochosos (anêmonas são animais entre marés, o que faz com que estejam expostas a altas taxas de luminosidade). Portanto geram grandes quantidades de oxigênio dissolvido.⁶ Outro fator, inclusive um dos mais estudados atualmente acerca do branqueamento, é o estresse oxidativo gerado em conta do aumento da temperatura ambiental, em conta de grandes problemas ambientais estudados na atualidade.^{2, 3, 23} Portanto, estas duas vias acarretam em altas concentrações de oxigênio, podendo acarretar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas ERO causam grandes danos celulares, como oxidação de membrana, desnaturação de proteínas e danos a ácidos nucleicos. Ambos parceiros da simbiose possuem adaptações consideráveis para lidarem com essas ERO, assim impedido os danos. Possuem enzimas especializadas como catalase, ascorbato, peroxidase e múltiplas formas de superóxido desmutase. Essas enzimas tem como função lidar com essas ERO. Porém quando os limites ultrapassam o nível de gestão a essas ERO do animal, acaba sobrecarregando as defesas e ocasionando severos danos. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) são formadas como resultado da redução parcial do oxigênio a água e são consideradas a classe mais importante de espécies radicais geradas nos sistemas vivos. As ERO são altamente reativas e podem ser não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou radicalares, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), que possuem um elétron desemparelhado na última camada. Grande parte das ERO (cerca de 90%) é produzida nas cadeias de transporte de elétrons - mitocôndria, retículo endoplasmático, membranas nucleares e no sistema fotossintético.^{24, 25, 26, 27} Os efeitos benéficos das ERO ocorrem quando estas se encontram em baixas e moderadas

concentrações. Nesses casos, elas participam de uma série de vias sinalizadoras em processos celulares, como ciclo celular, resposta ao estresse e metabolismo energético. Além disso, as ERO participam de processos tais como a defesa contra agentes infecciosos e indução da resposta mitogênica. Estudos tem demonstrado que as ERO, como H^2O^2 , podem agir como segundo mensageiros em muitas vias de transdução, como aquelas envolvidas em receptores de membrana de tirosina quinase, mediando estímulos ao estresse oxidativo.^{28, 29, 30}

O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento na produção de ERO a níveis que excedem a capacidade antioxidante do organismo, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox e/ou danos moleculares.³¹ O estresse oxidativo é responsável por causar danos às biomoléculas, especialmente lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, induzindo efeitos deletérios e alterando suas estruturas e/ou funções biológicas.³² As proteínas podem ser danificadas por vários mecanismos mediados pelas ERO como: radiação, produtos da peroxidação lipídica e oxidação de açúcares, metabólitos derivados de óxidos nítricos e sistemas de oxidação catalisados por metais.³³ Os danos ao DNA ocorrem principalmente pela reação deste com o $\cdot OH$, que causa danos principalmente nas bases nitrogenadas, purínica e pirimidínica.³⁴ A modificação permanente do material genético resultante do dano oxidativo representa o primeiro passo envolvido em processos mutagênicos, carcinogênicos e de envelhecimento.³⁵ Ambos os parceiros da simbiose tem adaptações consideráveis para o gerenciamento de ROS, afim de evitar celular danos. Ambos os parceiros expressam quantidades elevadas de moléculas antioxidantes. Entre as defesas antioxidantes, que combatem a excessiva produção de ERO, estão a SOD e acatalase (CAT) e glutatiónaperoxidase (GPx).^{33, 35, 36}

Sinalizadores

Podemos fazer uma analogia de toda sistemática do branqueamento com um complexo jogo, sendo o resultado desse jogo, a quebra da relação endossimbiótica entre cnidários hospedeiros e alga simbiote. Como todo jogo, esse processo tem inúmeras peças e jogadores, cada um com papel fundamental na sua resposta. Nas últimas décadas com o maior interesse pelo branqueamento, inúmeras peças envolvidas em processos sinalizadores começaram a aparecer com mais notoriedade nesse cenário. O branqueamento pode se dar por inúmeras causas e através de diferentes processos, que podem ocorrer simultâneos ou não, e também podem ou não fazerem parte da mesma via. A temperatura pode acarretar um estresse oxidativo, que faz com que haja quebra da simbiose. Como a temperatura também pode interferir na homeostase de cálcio, que pode mexer na via sinalizadora NO/cGMP. Da mesma forma que o cálcio pode interferir na adesão da alga no simbiote. Todas essas peças e jogadores são fundamentais para uma compreensão maior do processo como um todo. Este trabalho teve por objetivo integrar diferentes jogadores na resposta do branqueamento, e ver a qual via cada um pertencia.

Foi usado sinalizadores como cafeína afim de induzir liberação de cálcio, óxido nítrico e cGMP para entender essa complexa via que pode induzir apoptose, sendo que apoptose é reconhecidamente um jogador presente no branqueamento. Tudo isso a fim de entender a relação que temperatura, estresse oxidativo e moléculas sinalizadores tem no processo de branqueamento da anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*, como modelo para branqueamento de cnidários.^{5, 37}

Anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum*

As anêmonas-do-mar são pólipos solitários, pertencentes ao filo cnidária, da Classe Anthozoa, subclasse Zoantharia, Ordem Actiniaria. Um filo altamente diverso que possui notáveis características fisiológicas suscetíveis a investigação microscópica e fisiológica. Incluem águas-vivas, anêmonas do mar, mães da água, caravelas do mar, corais, hidras, hidóides e sinóforos.³⁸ Possuem simetria primária radial, tentáculos, estruturas urticantes ou adesivas (cnidas), cavidade gastrovascular incompleta como única cavidade corpórea e uma mesogléia (camada intermediária). Suas extremidades são descritas como “BUCAL” e “ABORAL”. Os cnidários carecem de cefalização, o sistema nervoso é uma rede nervosa simples, composto por neurônios nus e não polares, também não possuem estruturas individualizadas para trocas gasosas, excreção ou circulação. Além disso, são os animais que possuem menos tipos celulares que todos os outros animais (exceto esponjas e mesozoários), possuindo menos tipos de células que um único órgão de muitos outros animais. Este filo data do Pré-Cambriano (605 milhões de anos atrás), e seus membros tiveram papéis importantes em vários cenários ecológicos no decorrer de sua longa história.¹⁰ A coluna é cilíndrica e extremamente distensível com bastante variável, dependendo do grau de distensão do animal. Sua coluna apresenta vesículas simples distribuída de forma irregular. Sua coloração pode ser, amarelada, esverdeada, marrom ou castanha, tendo papel importante na sua camuflagem e defesa contra potenciais predadores.⁴

Estes animais são animais sésseis, osmoconformadores bentônicos, que habitam desde regiões intermarés, recifes costeiros rasos, costões rochosos a ilhas oceânicas e atóis.³⁹ Normalmente, podem ser encontrados associados a rochas ou em locais protegidos tais como fendas ou parte inferior das rochas, mas em situação de baixa maré podem se encontrar emersas.⁴⁰ Animais solitários que se alimentam de presas pequenas como peixes e crustáceos disponíveis ao seu redor, e que também absorvem matéria

orgânica dissolvida na água, além de muitas espécies apresentarem endossimbiontes fotossintetizantes.⁴¹ A espécie usada neste estudo foi *Bunodosoma cangicum* Correa 1964 é encontrada em regiões próximas a linha da água, na maioria das vezes paralela a areia, ficando submersas com a decida da maré.⁴⁰ A *B. cangicum* apresenta uma base firme e muito aderente bem desenvolvida, sempre se mostrando expandida quando fixada ao um substrato, como acontece por exemplo quando ela fica aderida nas rochas, costões rochosos, e outras possíveis bases que lhe permitam estabelecer-se de forma adequada. Sua distribuição se dá em zonas intermarés ao longo do litoral do Brasil e Uruguai, em ambientes costeiros. Comumente encontradas na região Sul e Sudeste do Brasil. *Bunodosoma cangicum* é a espécie em maior abundância da costa brasileira.⁴⁰ As anêmonas são animais de fundamentais importâncias ecológica nos ambientes marinhos, pois além de participarem da cadeia alimentar marinha, apresentam relações simbióticas com outros organismos, como as zooxantelas presentes em seus tecidos.⁵

BIBLIOGRAFIA:

¹ LIÑÁN-CABELLO et al. 2010. Response to Short Term Ultraviolet Stress in the Reef-Building Coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). *Revista de Biología Tropical* 58. 103–118.

² DOUGLAS. 2003. Coral Bleaching--How and Why? *Marine Pollution Bulletin* 46.385–392.

³ WEIS. 2008. Cellular Mechanisms of Cnidarian Bleaching: Stress Causes the Collapse of Symbiosis. *The Journal of Experimental Biology* 211. 3059–3066.

⁴ FRANSOLETT et al. 2012. Establishment of Endosymbiosis: The Case of Cnidarians and Symbiodinium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 420. 1–7.

⁵ SAWYER et al. 2001. Cellular Mechanisms Underlying Temperature-Induced Bleaching in the Tropical Sea Anemone *Aiptasia pulchella*. *The Journal of Experimental Biology* 204. 3443–3456.

⁶ GATES et al. 1992. Temperature Stress Causes Host Cell Detachment in Symbiotic Cnidarians: Implications for Coral Bleaching. *Biological Bulletin* 182. 324-330.

- ⁷ DOWNS et al. 2002. Oxidative Stress and Seasonal Coral Bleaching. *Free Radical Biology & Medicine* 33. 533–543.
- ⁸ BOUCHARD et al. 2008. Heat Stress Stimulates Nitric Oxide Production in *Symbiodinium Microadriaticum*: A Possible Linkage between Nitric Oxide and the Coral Bleaching Phenomenon. *Plant & Cell Physiology* 49. 641–652.
- ⁹ ROSENTHAL et al. 2005. Increased Zooxanthellae Nitric Oxide Synthase Activity Is Associated with Coral Bleaching. *The Biological Bulletin* 208. 3–6.
- ¹⁰ BRUSCA et al. 2007. *Invertebrados*. 2^a edição. Brasil: Guanabara Koogan. 678 pg.
- ¹¹ GLYNN et al. 1990. Experimental Evidence for High Temperature Stress as the Cause of Coral Mortality. *Coral Reefs* 8. 181–191.
- ¹² GULDBERG et al. 1989. Light, salinity, and temperature and the population density, metabolism and export of zooxanthellae from *Stylophorapistillata* and *Seriatopora hystrix*. *Journal of Marine Biology Ecology* 129. 279-303.
- ¹³ KLEPPEL et al. 1989. Changes in pigmentation associated with the bleaching of stony corals. *Limnology and Oceanography* 34. 1331-1335.
- ¹⁴ SCHEIBLING et al. 1984. Mass mortality of *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinodermata: Echinoidea) off Nova Scotia, Canada. *Marine Biology* 78. 153-164.
- ¹⁵ LESSIOS et al. 1984. Spread of *Diadema* mass mortality through the Caribbean. *Science* 226. 335-337.
- ¹⁶ JEANIKÉ. 1991. Mass extinction of European fungi. *Trends in Ecology and Evolution* 6. 174-175.
- ¹⁷ SINGER. 1989. *Global climate change: human and natural influences*. New York, Paragon House. 424p.
- ¹⁸ VENN et al. 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* 59. 1069-1080.
- ¹⁹ YELLOWLEES et al. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant Cell Environ.* 31. 679-694.
- ²⁰ DOUGLAS. 1994. *Symbiotic Interactions*. Oxford: Oxford Science Publications.
- ²¹ JONES et al. 1998. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell Environ.* 21. 1219-1230.
- ²² BANIN et al. 2001. Role of endosymbiotic zooxanthellae and coral mucus in the adhesion of the coral-bleaching pathogen *Vibrio cholerae* to its host. *Microbiology Letters* 199. 33–3.

- ²³DUNN et al. 2002. Programmed cell death and cell necrosis activity during hyperthermic stress-induced bleaching of the symbiotic sea anemone *Aiptasia* sp. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* 272. 29–53.
- ²⁴HERMES-LIMA et al. 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell and Molecular Responses to Stress*. 2. 263-287.
- ²⁵MILLER et al. 1990. Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 8. 95-108.
- ²⁶STOREY. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29. 1715–1733.
- ²⁷LUSHCHAK et al. 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37. 1670- 1680.
- ²⁸GORR et al. 2010. Hypoxia Tolerance in Animals: Biology and Application. *Physiol. Biochem. Zool.* 83. 733-752.
- ²⁹VALKO et al. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. B* 39. 44-84.
- ³⁰RHEE et al. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE*. 53. 117-30.
- ³¹SIES et al. 2007. Oxidative stress. In: FINK, G. *Encyclopedia of Stress*. 2 ed. USA: Elsevier, Academic Press, 3:45-48.
- ³²HOUGHTON et al. 1990. Climate change, the IPCC scientific assessment. Cambridge, Mass, p 365.
- ³³HERMES-LIMA. 2004. Oxidative stress and medical sciences. In: STOREY, K.B. (ed.), *Functional Metabolism: Regulation, and Adaptation*. New York: John Wiley and Sons, p.269-282.
- ³⁴ HALLIWELL et al.1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. Oxford University Press.
- ³⁵VALKO et al. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. B* 39: 44-84.
- ³⁶ LESSER. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68. 253-278.
- ³⁷HAWKINS et al. 2013. Nitric Oxide Mediates Coral Bleaching through an Apoptotic-like Cell Death Pathway : Evidence from a Model Sea Anemone-Dinoflagellate Symbiosis. 1–9.

³⁸GOMES et al. 1998. Distribution , Abundance and Adaptations of Three Species of Actiniidae (Cnidaria , Actiniaria) on an Intertidal Beach Rock in 2.

³⁹ CAPITANI. 2007. Joana Dutilh De Capitani Estrutura Populacional E Variabilidade Genética de Anêmonas-Do-Mar Da Região Entremarés de Costão Rochoso.

⁴⁰ MELO et al. 2005. Ampliação Da Distribuição Das Anêmonas-Do-Mar Distribution Enlargement Of Some Sea Anemones (Cnidaria , Actiniaria) In The State Of Pernambuco , Brazil .Distribution, 19–31.

⁴¹WATSON et al. 2009. Mechanosensitivity in the Model Sea Anemone *Nematostella Vectensis*. *Marine Biology* 156. 2129–2137

Objetivos

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo estudar o processo envolvidos e algumas vias que ocasionam o branqueamento que ocorre em cnidários, em decorrência da quebra da endossimbiose entre *Bunodosoma cangicum* e alga simbiótica.

Objetivos Específicos

- Analisar o efeito do aumento da temperatura da água, na anêmona do mar *Bunodosoma cangicum*, como modelo para quebra endossimbiótica entre cnidários e algas simbiotes, que resulta no evento conhecido como branqueamento.
- Estudar a resposta da anêmona do mar *Bunodosoma cangicum* quando exposta a um aumento de espécies reativas de oxigênio. Modelo este usado para compreender melhor o branqueamento em cnidários em função do estresse oxidativo.
- Investigar e compreender, em parte, o papel das vias sinalizadoras que alteram homeostase do cálcio, adesão celular e resposta apoptótica envolvidas na quebra endossimbiótica entre cnidários e algas, evento esse conhecido como branqueamento.

MANUSCRITO

Manuscript Comparative Biochemistry and Physiology part A

An inquiry into the molecular pathways which may signal the disruption of the symbiosis between algae and anemone in the tentacles of *Bunodosoma cangicum*.

Marcelo Tavares Alalan^a and Robert Tew Boyle^{ab}.

^a **Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil**

^b **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil**

Abstract

Our study tests the capacity of two well known signaling molecules, nitric oxide and cyclic GMP, to induce the collapse of the symbiotic relationship between *Symbiodinium* micro-algae (zooxanthellae) and their host, *Bunodosoma cangicum*, even at moderate temperature. The response models coral bleaching as both of these compounds induce an expulsion of the symbiotic algae. We also show that caffeine produces the same effect, which is in agreement with studies in other cnidarian/algae symbioses. Our group has developed a semi-quantitative index, termed Relative Symbiotic Viability to help compare degrees of bleaching in response to various stimuli, including temperature. We additionally show that bleaching induced by oxidative stress changes the fluorescent emission profile of the zooxanthellae which remain associated with the host, which be useful in tracking oxidative stress in other algae/cnidarian symbioses.

Key words: coral bleaching, molecular signaling, symbiosis

1. Introduction

Coral bleaching is generally defined as a decline in the production of symbiotic algae within a coral colony (Douglas 2003). It is manifest as a loss in the natural green, yellowish or brown colors, which are provided by the symbiotic micro-algae of the

Symbiodinium genus, also known as zooxanthellae. Algal chlorophyll and carotenoids furnish coloration to the coral tentacles, or other host *Cnidarian* (Sawyer & Muscatine 2001) (Douglas 2003). The loss of algae which leads to bleaching is believed to be caused by various contributing factors, including but not necessarily limited to: global warming, increased incidence of UV radiation, microbial pathogens, as well as anthropogenic factors such as pollution. These intertwined elements drive the now global phenomenon of coral bleaching (Bouchard & Yamasaki 2008). The term itself “coral bleaching” is a bit misleading as many reef dwelling organisms maintain symbiotic relationships with micro-algae: foraminifera, sponges, hydrocorals, anemones, alcionarian (soft) corals, zoanthids and tridactinidian (giant) clams, along with scleractinian (hard) corals; all of these organisms may possess endo-symbionts which can be lost during bleaching events (Williams & Bunkley-Williams 1989). Additionally, bleaching adversely affects many other vertebrates and invertebrates that depend upon a healthy coral reef for successful feeding, growth, and reproduction (Jokiel & Coles 1990; Venn et al. 2008). Coral bleaching events during the decades of the 80's and early 90's, exhibited a powerful selective force on all reef reserves of the planet. Among the various immediate effects observed: the decline in the density of endo-symbionts, as well as the loss of their photosynthetic pigments. There are also less obvious physiological effects such as an increase in respiratory rates of coral, and the decline in the levels of proteins, lipids and carbohydrates of scleractinian colonies. Additionally we must also consider detrimental, albeit non-lethal consequences to reef systems over the long term, such as reductions in the growth rate and calcification of coral, and overall reproductive decline (Williams & Bunkley-Williams 1989).

While there has been continuing research into both natural and anthropogenic factors associated with coral bleaching, little is known about the cellular physiological

mechanisms involved in the destruction of the algal/cnidarian symbiosis (Lesser 2004). There is a paucity of data describing the signaling events which trigger the expulsion of symbiotic algae from their cnidarian hosts. In 2001, Sawyer and Muscatine investigated a possible link between elevated temperatures, intracellular calcium concentrations and bleaching in the tropical sea anemone *Aiptasiapulchella*. They concluded that calcium levels did not fluctuate with increased temperature and that bleaching may be signaled by changes in protein phosphorylations (Sawyer & Muscatine 2001). In 2008, Bouchard and Yamasaki showed that the principal symbiotic algae, *Symbiodiniummicroadriaticum* can produce the signaling molecule, nitric oxide (NO) and that NO levels rise with temperature (Bouchard & Yamasaki 2008), but the use of diaminofluorescein (DAF) to quantify NO has been questioned and Bouchard's results might have been equivocal (Planchet 2006). In 2013, Hawkins and Davy confirmed the capacity for NO generation in *Symbiodinium* and showed that NO production increased along with ambient temperatures (Hawkins & Davy 2013; Hawkins & Davy 2012).

There are some studies into the possible roles of apoptosis and autophagy as a means to expel zooxanthellae (Dunn et al. 2007). Also, attention has focused onto the participation of oxidative stress as a precursor to bleaching (Lesser 2006; Downs et al. 2002). There however remains an enormous lacuna in terms of our understanding of bleaching processes. Thus the purpose of our study was two-fold: to develop bleaching models and analyses on a laboratory scale, and to try to initiate the development of a plausible signaling cascade which leads to the bleaching response.

2. Method

2.1 Collection, maintenance and acclimatization of animals

Anemones *B. cangicum* were collected from the sandy areas surrounding a concrete jetty (molhes da barra) in Cassino Beach, located in the city of Rio Grande, the state of Rio Grande do Sul, in Southern Brazil (32° 09 ' 40.25 " S; 52° 05 ' 51.96 " W). The animals were subsequently transported to the laboratory and maintained in aquaria with natural seawater at 24°C with constant aeration and a light cycle of 12h light/12h dark. The water was changed weekly and the animals were hand fed small pieces of shrimp and fish.

2.2 Determination of the Relative Symbiotic Viability (RSV)

Index

Tentacles transected from *B. cangicum* were solubilized in aqueous NaOH (1M) according to the method of Zamoum (Zamoum&Furla 2012). This treatment created a suspension of liberated, intact alga which was quantified by hemocytometer from digital images captured by an Olympus DP72 CCD camera attached to an Olympus IX81 epi-fluorescent microscope (transmitted light mode), using NIH ImageJ freeware. The remainder of the samples were then centrifuged and the supernatants were assayed for total protein content by a commercial kit based on the Biuret method (Kit de Proteínas Totais Doles, Doles Reag. Equip. para Laboratórios Ltda., Goiânia - GO - Brasil). The proportion of algae concentration to total tentacular protein concentration was determined for control conditions (24°C and time 0) and this ratio was transformed to 100% Relative Symbiotic Viability (RSV) to use as a percentual comparison with the experimental conditions.

2.3 Laser scanning confocal microscopy

Freshly isolated tentacle samples were analyzed by a Leica TCS SP8 laser scanning confocal microscope. The microscope's photomultiplier detectors' (PMTs)

wavelength bands were positioned to take advantage of chlorophyll a and carotenoid autofluorescence. Fluorescent signal from the algae populated tentacle was divided into two channels: for PMT-1, the emission wavelengths of 650nm to 685nm was used to determine the combined chlorophyll a and carotenoid composition of the algae, and for PMT-2, fluorescence signal above 695nm was used to determine carotenoid composition as its emission signal predominates in the near infrared wavelengths. Laser excitation intensities (405nm or 488nm) and detector gains were maintained at constant values to permit semi-quantitative analyses for all experiments. Digital image stacks were analyzed with NIH Image J freeware.

2.4 Experimental design (temperature stress)

The subject animals were removed from the acclimation tanks and placed in experimental tanks of 0.5 Liter. An adjustable height, 300 Watt metal halide lamp was used to increase temperatures for experiments. The radiant energy produced by the lamp was measured at various distances and for different wavelengths, using an International Light Technologies ILT-1400 Radiometer/Photometer. At the distance which produced a peak temperature of 30°C, the lamp produced the following energies: Visible light (PAR) (7.2 ± 0.08 mW/cm²), IR (9.1 ± 0.2 mW/cm²), UVa (15.6 ± 0.4 μW/cm²). There were no detectable levels of UVb or UVc. At the distances which produced the temperatures above 30°C, the lamp output was not different for (35°C, 37°C or 40°C): Visible light (PAR) (11.0 ± 0.13 mW/cm²), IR (10.1 ± 0.08 mW/cm²), UVa (26.1 ± 0.4 μW/cm²), UVb (0.2 ± 0.09 μW/cm²). There were no detectable levels of UVc. The temperature regimes used in the study are depicted in Figure 1. The lamp auto-timer supplied power to the lamp each day from 8:00 am to 6:00 pm (8-18 in Figure1). Experiments with peak temperatures of 40°C were aborted after 24 hours, as no animals survived this experimental temperature.

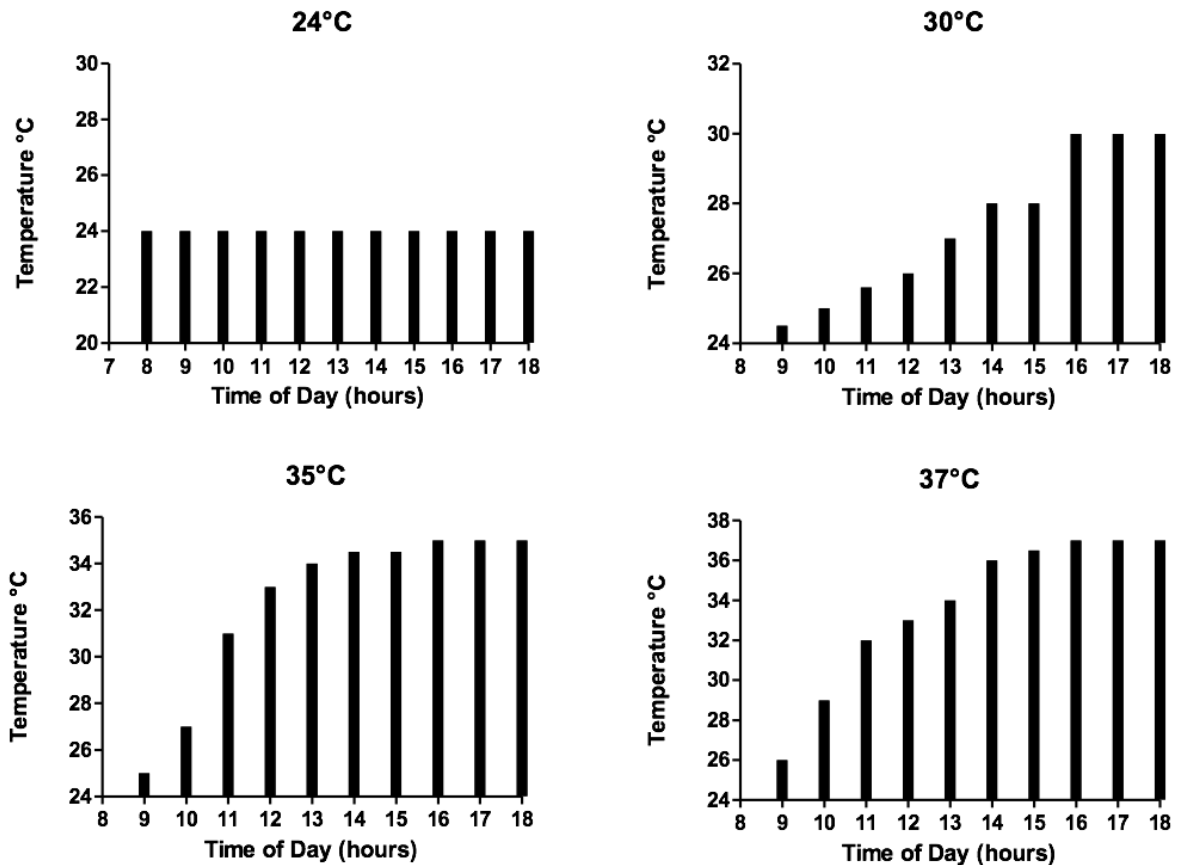


Figure 1 - Representative aquarium water temperatures at control conditions (24°C) and temperatures produced by the irradiance of a metal halide lamp, measured each hour during a 10 hour period. As evident in the graphics for 30°C, 35°C and 37°C, the experimental temperatures used in this study are peak temperatures with a duration of approximately 3 hours every 24 hour cycle. The 24°C graphic is the constant control/acclimation temperature of the laboratory.

2.5 Experimental design (second messenger signaling)

The subject animals were removed from the acclimation tanks and placed in experimental tanks of 0.5 Liter containing artificial seawater (ASW), composition in mM: NaCl 399.71, KCl 8.82, CaCl₂ 8.82, MgSO₄ 45.88 e NaHCO₃ 2.21 pH 7.8. Whole animals were exposed to one of the following compounds: sodium nitroprusside (1 mM for 1 hour), caffeine (5mM for 1 hour), dibutyl cyclic GMP (25µM for 1 hour) and hydrogen peroxide (5mM for 1 hour). After experimental treatment, random tentacles

were prepared for RSV determination as described in section 3.2. Other tentacles from the same animal were placed in an acrylic slide chamber with zero calcium ASW (to inhibit spontaneous contractions of the tentacle). These samples were immediately inspected by confocal microscopy as described in section 3.3. Control samples were obtained before the application of experimental treatment in each case. All manipulations involving second messenger compounds were performed at the control/acclimation temperature of 24°C.

2.6 Statistical Analyses

The mean and standard error of the mean (SEM) were calculated for all data. For the relative symbiotic viability experiments, significant differences between control and treatment groups were determined by paired T-tests. For the fluorescence analyses, significant differences between control and treatment groups were determined by one-way ANOVA, employing Tukey's post-test. An alpha of 0.05 was adopted as the significance threshold for all experiments. All statistical analyses and figure graphics were produced using GraphPad Prism.

3. Results

Our first objective was to establish a criterion to evaluate the quality or viability of the symbiotic relationship between *B. cangicum* and the zooxanthellae. We developed a simple ratio, based upon well established cell biology techniques, that allows us to track relative "bleaching" in *B. cangicum*. Figure 2 exhibits our relative symbiotic viability (RSV) index at controls conditions, during extended periods in the laboratory. At the end of one month, the RSV has declined approximately 10%. This

result is in agreement with our empirical observations that the tentacles of anemones kept in the laboratory will become completely white in 8 to 9 months (unpublished).

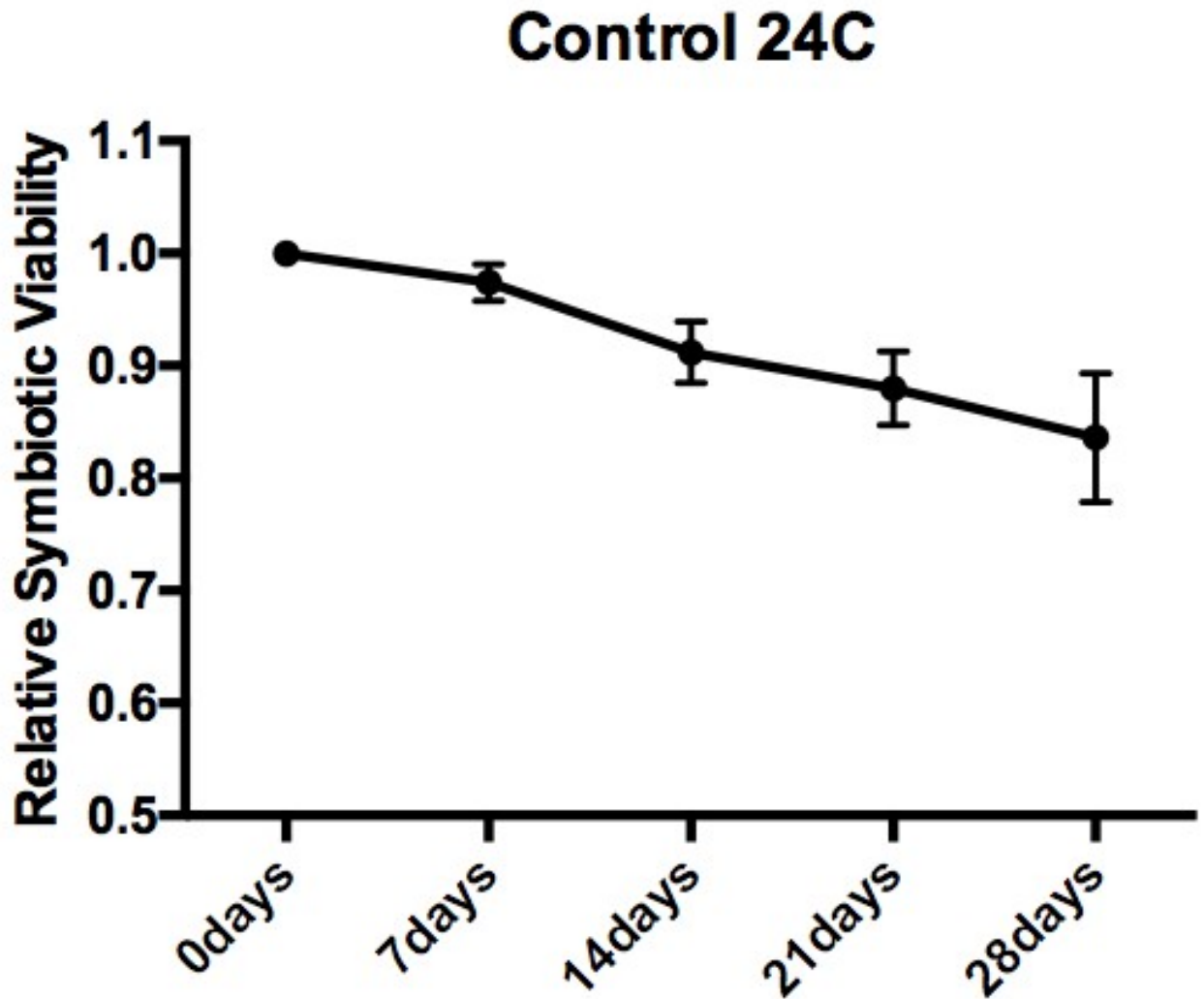


Figure 2 The relative symbiotic viability of *B. cangicum* specimens kept in constant laboratory conditions of temperature and luminosity, declines gradually to about 90% over the course of 1 month. Data shown are means \pm SEM, N=5.

After we developed the RSV index, we decided to use this parameter to compare groups of anemones exposed to various elevated temperature regimes as described in Methods. The results of these experiments are shown in Figure 3.

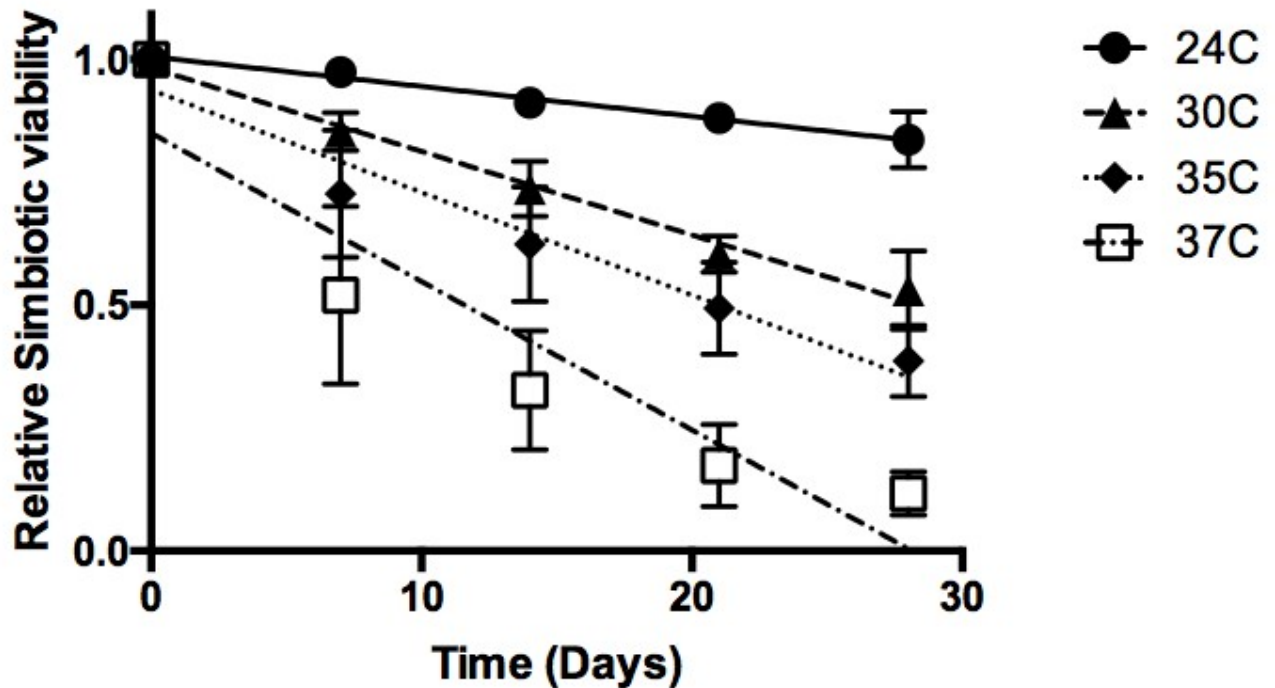


Figure 3 The relative symbiotic viability of *B. cangicum* specimens declines at increasing rates with respect to increasing temperature. The linear rates are significantly different among the temperatures tested, $P < 0.01$. Data shown are means \pm SEM, $N=5$.

Our interpretation of Figure 2 is that we have succeeded in some important, albeit preliminary facets of our study, in that we have most likely produced repeatable bleaching conditions on a small laboratory scale. Additionally, our experimental model has provided consistent and expected responses to temperature stress. Therefore, we feel we may have developed a parameter, RSV index, that may be useful in analyzing bleaching events.

There is mounting evidence that bleaching may be precluded by oxidative stress in the symbionts. Clearly, algal photosynthetic activity generates a basal level of oxygen, however, increased ambient temperatures can lead to oxidative stress, which may in turn trigger the expulsion of zooxanthellae. Perhaps the most prevalent view point among researchers in this area is that bleaching may be an innate immune

response by the host organism to alleviate oxidative damage (Weis 2008; Douglas 2003; Dunn et al. 2002; Hawkins & Davy 2012; Sawyer & Muscatine 2001). Therefore we decide to experimentally induce oxidative stress in *B. cangicum* to determine what effect that stress could produce in the RSV index. The results of these experiments are shown in Figure 4.

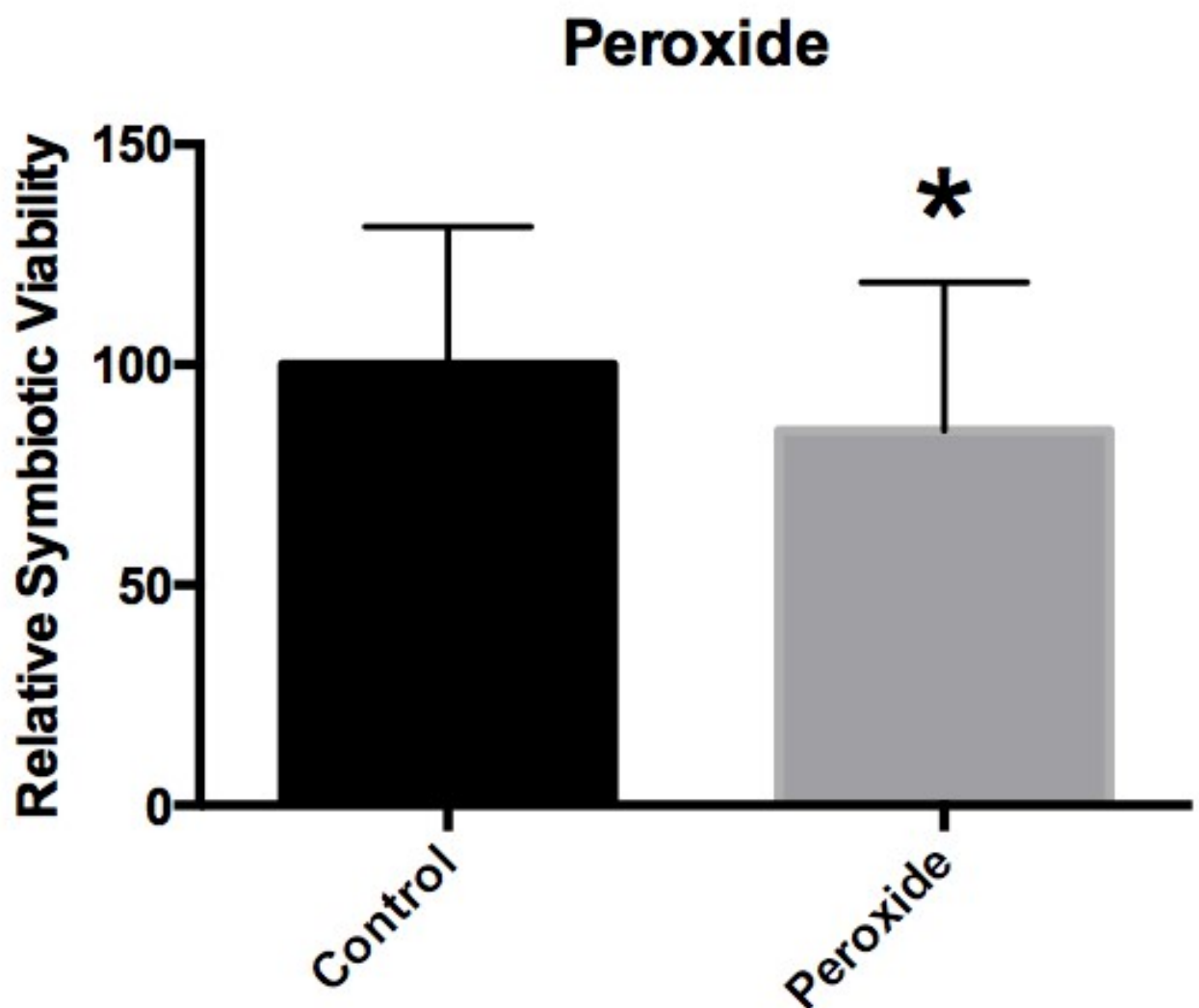


Figure 4 Whole animals exposed to 5mM hydrogen peroxide for 1 hour experience a small but significant decline in Relative Symbiotic Viability. Groups were compared by a paired T-test, $P=0.002$. Data shown are means \pm SEM. $N=7$.

With the understanding that cellular signaling events which lead to the disruption of the algae/cnidarian symbiosis are poorly understood, we decided to test various ubiquitous signaling compounds, and evaluate their effects upon the RSV, to try to begin to construct a cogent signaling pathway which may describe the molecular events involved in the breakdown of the algae/cnidarian symbiosis. Caffeine has been previously shown to induce bleaching in *A. pulchella* by a mechanism that is independent of changes in intracellular calcium, $[Ca^{2+}]_i$ (Sawyer & Muscatine 2001). Our results with caffeine are shown in Figure 5.

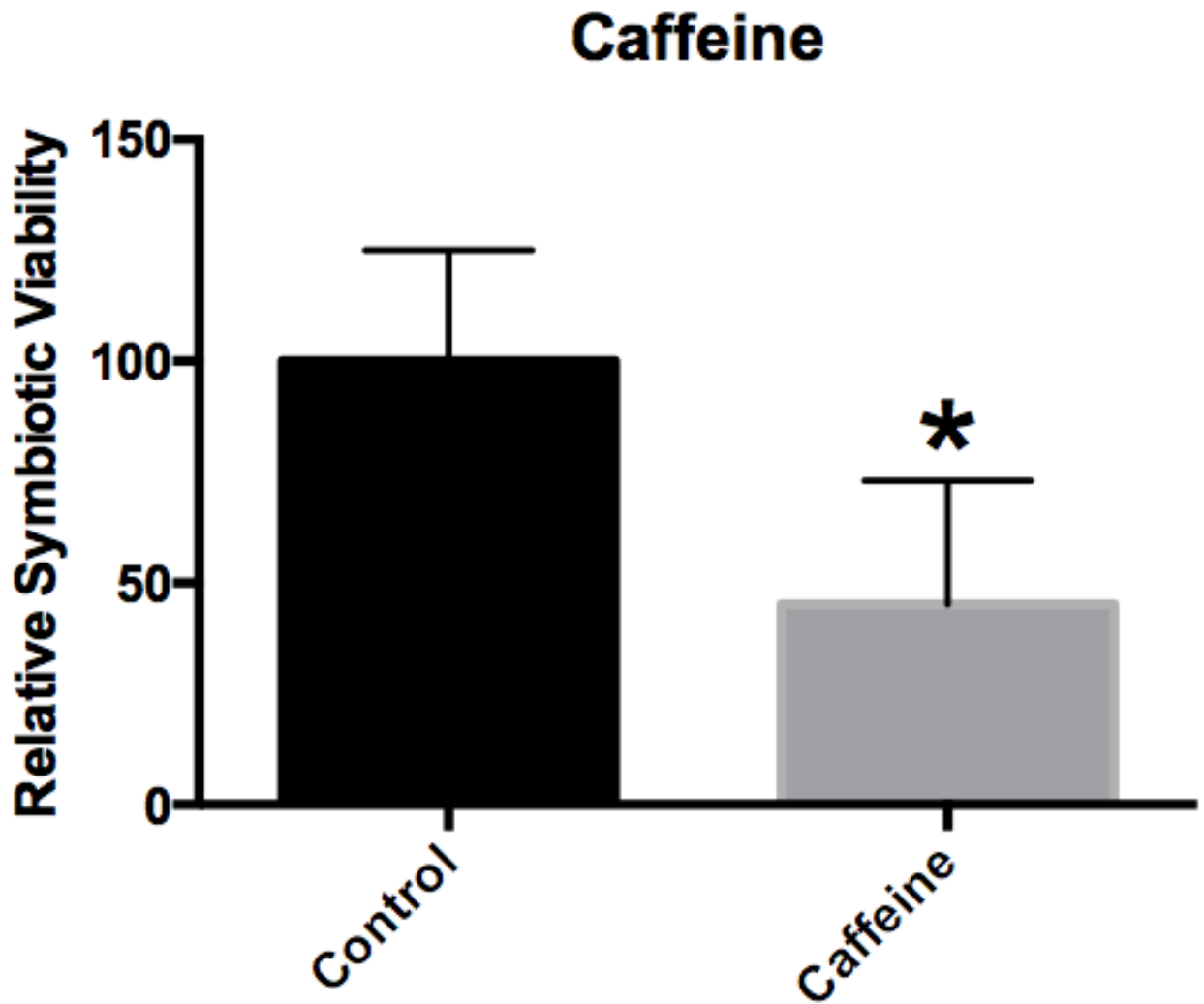


Figure 5 Whole animals exposed to 5mM caffeine for 1 hour experience a large significant decline in Relative Symbiotic Viability. Groups were compared by a paired T-test, $P=0.03$. Data shown are means \pm SEM. $N=8$.

One of the principle objectives of this project was to determine if paradigmatic signaling pathways may participate in the molecular processes which lead to the breakdown in the symbiosis between zooxanthellae and *B. cangicum*. To investigate this possibility we tested the effects of the nitric oxide (NO) donor nitroprusside on the RSV. Interestingly, the role of NO in symbiotic collapse has mainly focused on zooxanthellae as the source of NO production (Hawkins & Davy 2012; Bouchard &

Yamasaki 2008; Hawkins & Davy 2013; Safavi-Hemami et al. 2010). The results of our experiments with NO are shown in Figure 6.

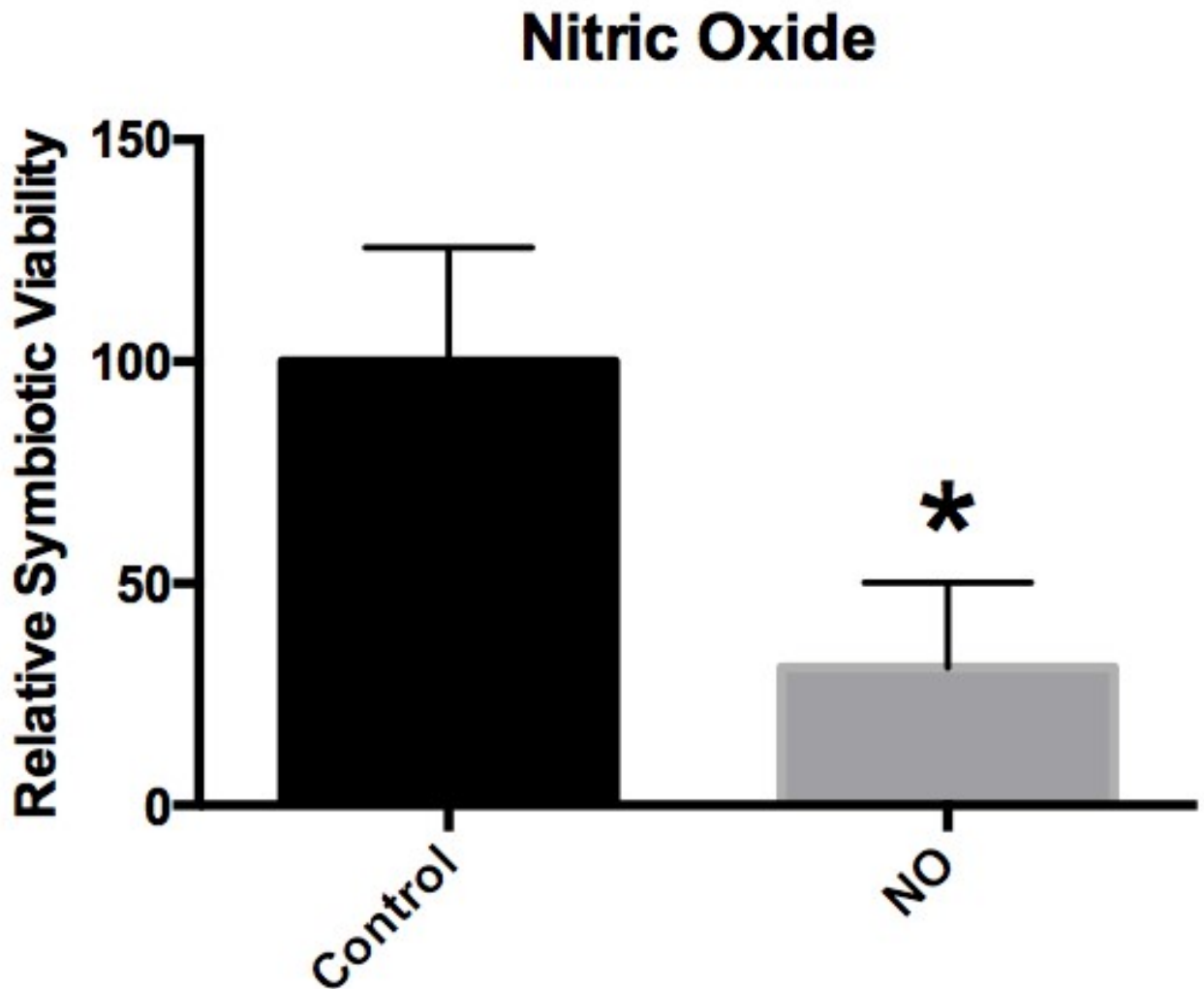


Figure 6 Whole animals exposed to 1 mMnitroprusside for 1 hour experience a large significant decrease in Relative Symbiotic Viability. Groups were compared by a paired T-test, $P=0.01$. Data shown are means \pm SEM. $N=8$.

We next decided to test the participation of cyclic GMP in a plausible pathway to break the algae/cnidarian symbiosis. Although cGMP has been implicated in the studies that have investigated NO. We are unaware of any other group that has tested cGMP directly. The results of our experiments with cGMP are shown in Figure 7.

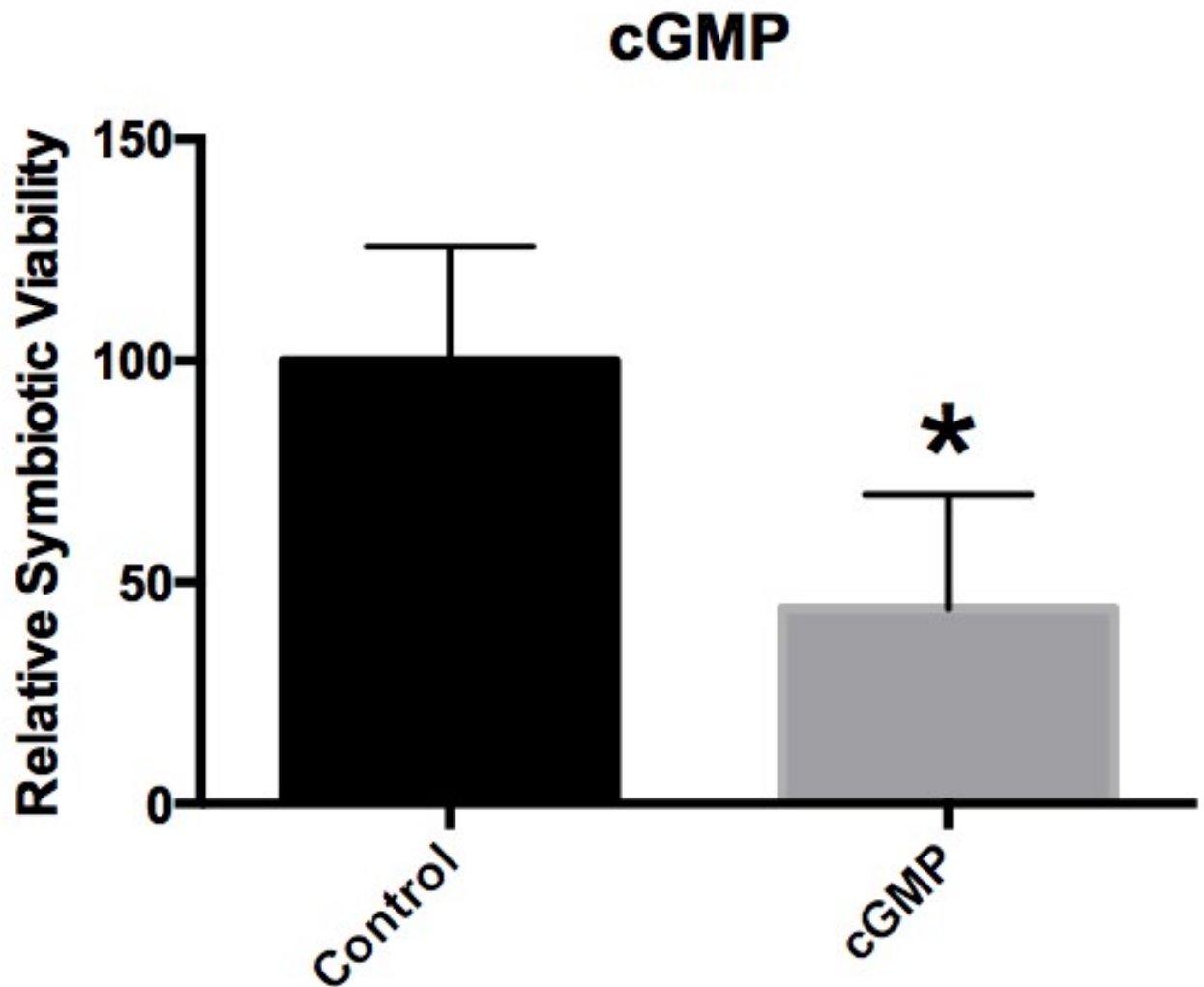


Figure 7 Whole animals exposed to 25 μ M dibutylcGMP for 1 hour experience a large significant decrease in Relative Symbiotic Viability. Groups were compared by a paired T-test, $P=0.02$. Data shown are means \pm SEM. $N=8$.

In all of our experiments we have shown that the tentacles of *B. cangicum* are losing symbiotic algae. One may surmise from the figures that these losses fall short of 100 percent, i. e. in experiments which induced the loss of algae, some algae remain associated with the anemone tentacle. We wished to determine the relative health of this algae. In 2006 Agustín and collaborators that the ratio of chlorophyll a to carotenoids could be used as a marker of stress in zooxanthellae (Marco Agustín et al. 2006).

According to this group, coral under the stress of bleaching have zooxanthellae with decreased chlorophyll a to carotenoid ratios as compared to healthy coral. We decided to track the relative abundance of these compounds through fluorescence analysis. Chlorophyll a and carotenoids have very similar fluorescence emission profiles from 650nm to 700nm. At wavelengths above 700nm, carotenoid emission begins to predominate and chlorophyll emission ceases. Thus by assigning these wavelength bands to different channels, we could measure if proportions of carotenoids to chlorophyll were changing. Figure 8 shows how the fluorescent profile of tentacles from *B. cangicum* can change when submitted to oxidative stress by hydrogen peroxide.

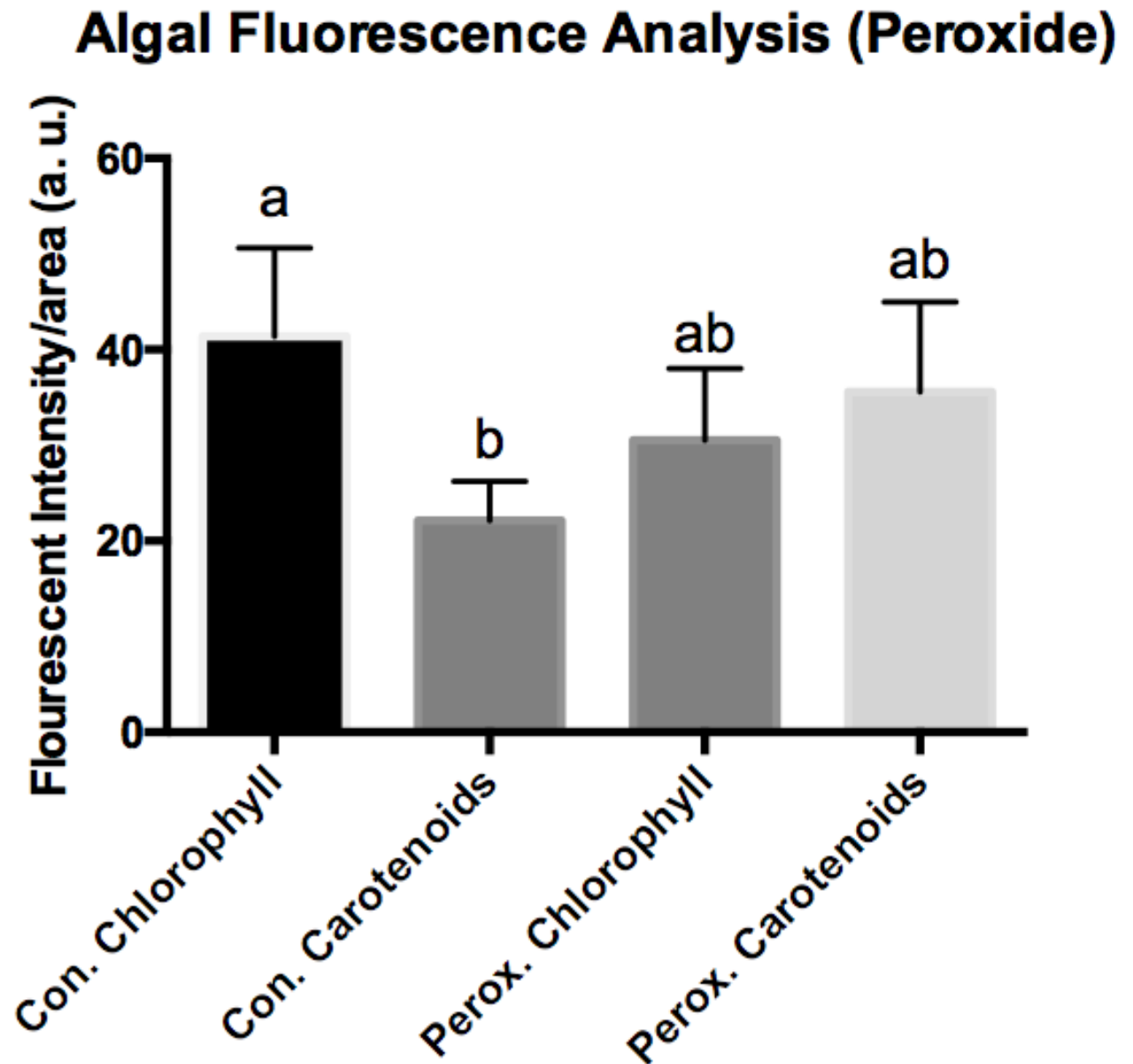
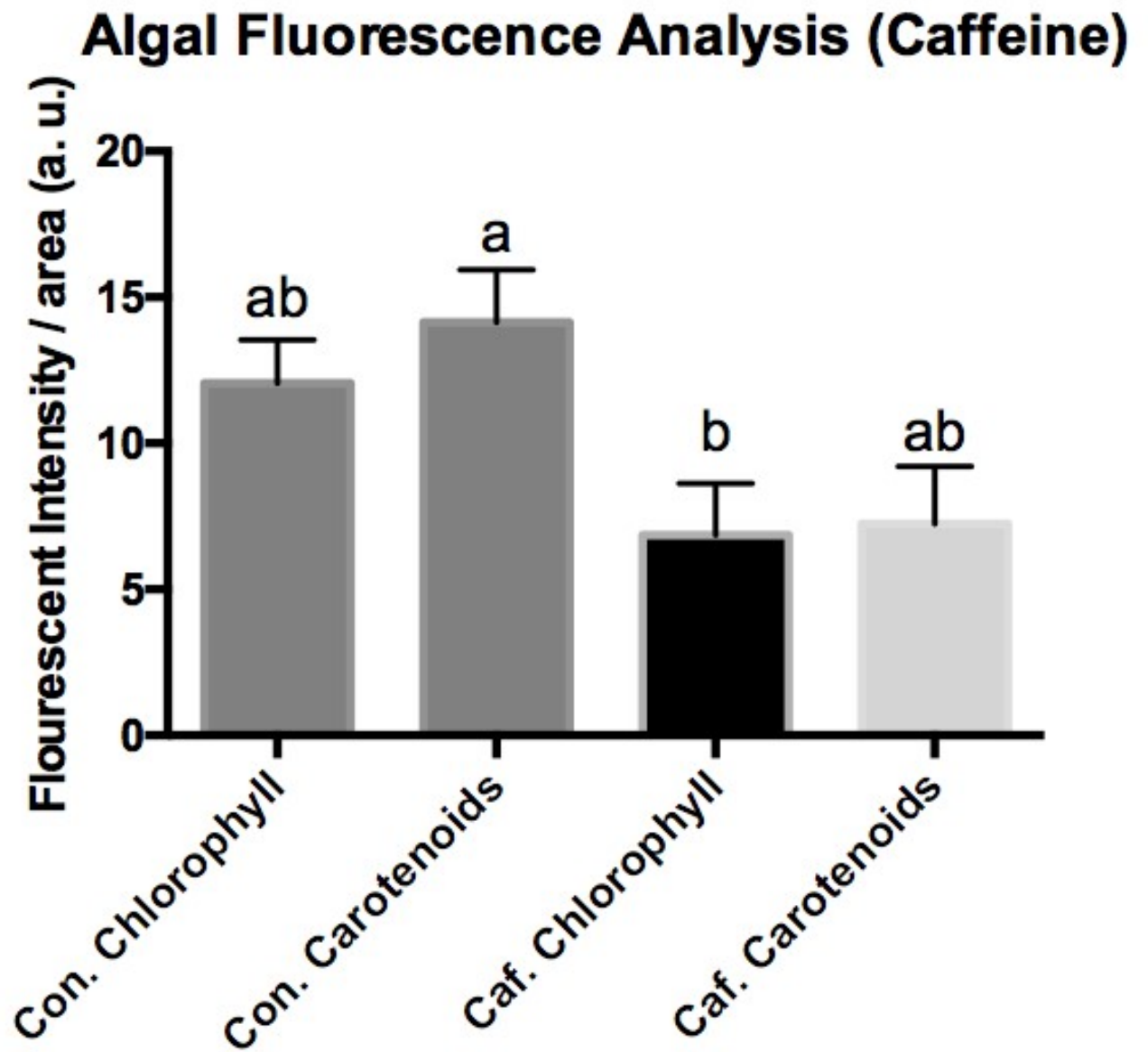


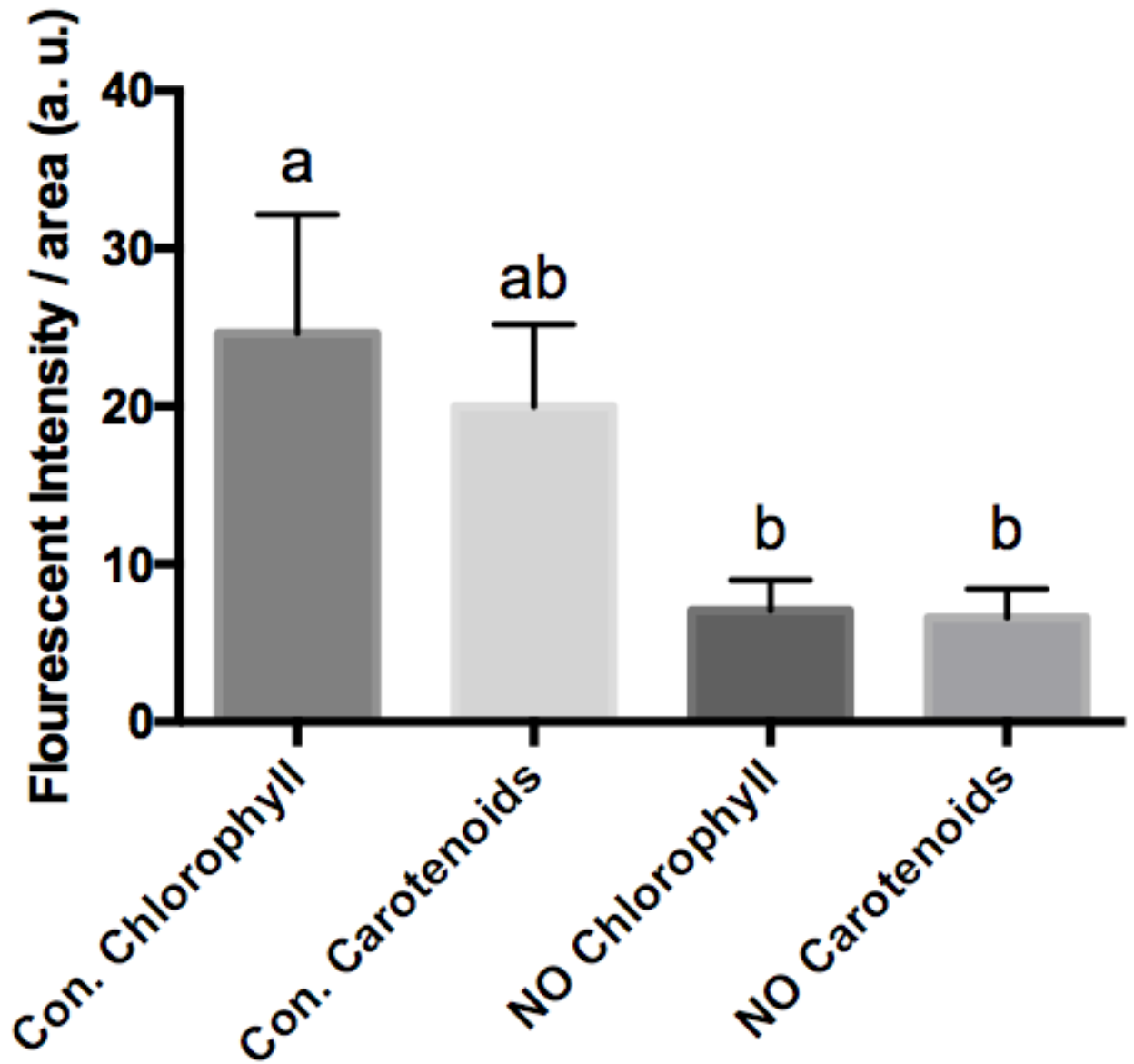
Figure 8 One-way ANOVA analysis of the fluorescent signals derived from intact tentacles from *B. cangicum*, comparing control and peroxide (5mM, 1hour). Different letters indicate a significant difference among groups by Tukey's post-test, $p=0.01$, $N=7$. Data shown are means \pm SEM.

We repeated this fluorescent analysis for each of the signaling molecules previously employed in the RSV analyses. The results of these experiments are shown in Figure 9.



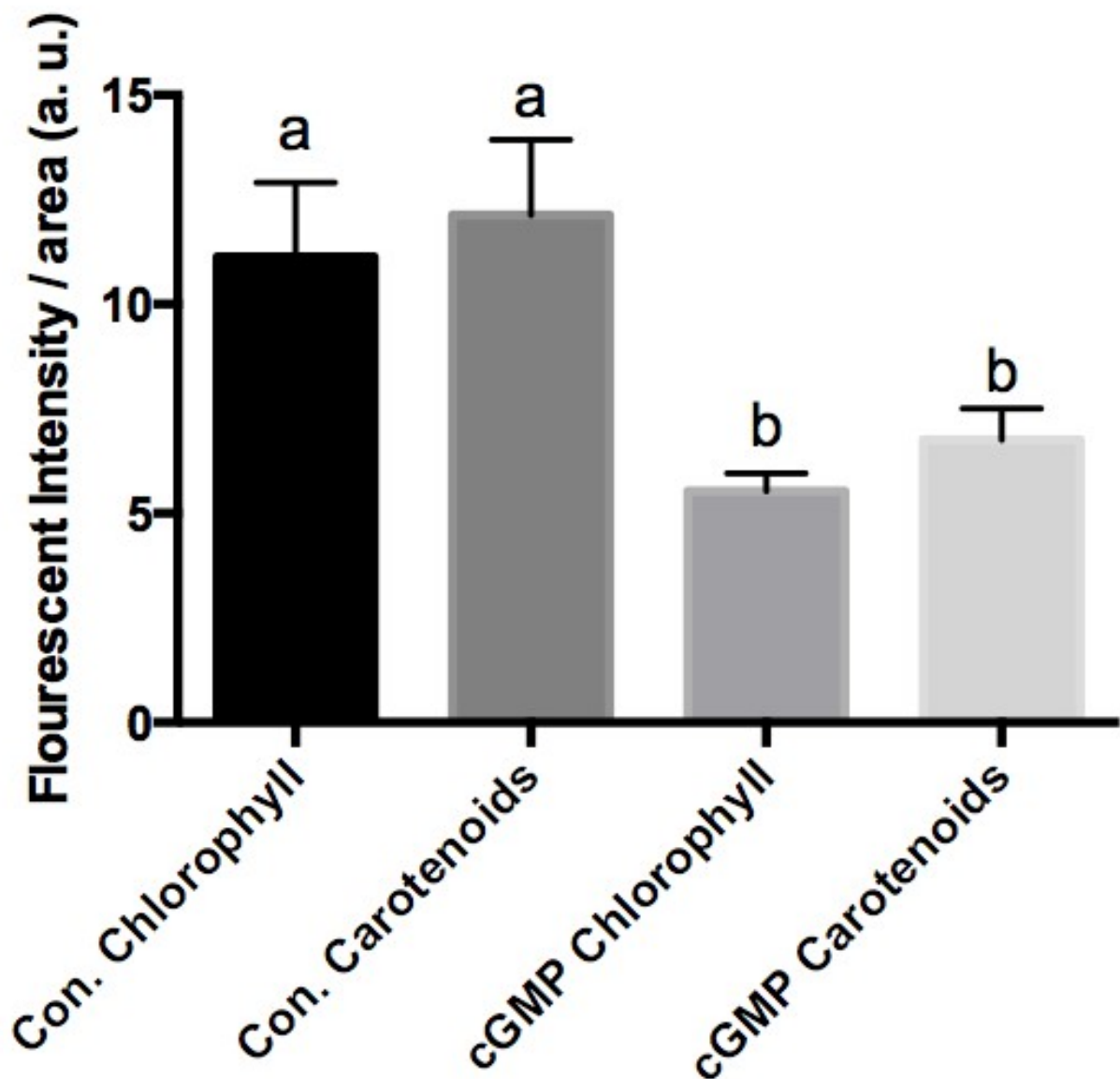
1. Figure 9 A

Algal Fluorescence Analysis (NO)



2. Figure 9 B

Algal Fluorescence Analysis (cGMP)



3. Figure 9 C

Figure 9 One-way ANOVA analysis of the fluorescent signals derived from intact tentacles from *B. cangicum*, comparing control and caffeine (5mM, 1hour). Different letters indicate a significant difference among groups by Tukey's post-test, $P=0.02$, $N=6$. Data shown are means \pm SEM (A). One-way ANOVA analysis of the fluorescent signals derived from intact tentacles from *B. cangicum*, comparing control and nitroprusside (1mM, 1hour). Different letters indicate a significant difference among groups by Tukey's post-test, $P=0.02$, $N=6$. Data shown are means \pm SEM (B). One-way ANOVA analysis of the fluorescent signals derived from intact tentacles from *B. cangicum*, comparing control and dibutylcGMP (25 μ M, 1hour). Different letters indicate a significant difference among groups by Tukey's post-test, $P=0.004$, $N=8$. Data shown are means \pm SEM (C).

4. Discussion

Research into coral bleaching over the past decades has shifted focus from somewhat empirical studies of strictly temperature based stimuli, to investigations of the more refined mechanisms of oxidative stress. Even so, no one knows how oxidative stress can generate a molecular signal to break the normally advantageous symbiosis between algae and cnidarian. We don't know which specific biomolecules could participate in putative cascades. There are a few studies that suggest a participation of NO in bleaching processes (Trapido-Rosenthal et al. 2005; Safavi-Hemami et al. 2010). We know that zooxanthellae produce NO and that this production increases with temperature (Bouchard & Yamasaki 2008; Hawkins & Davy 2012). But to our knowledge, our group is the first to show NO and cGMP directly producing an expulsion of algae from the cnidarian host, at ambient, non-stressful temperatures (24°C) and these measurements are corroborated by 2 independent methods; the RSV index and our autofluorescent analyses. Our study also indicates that an abundantly dispersed anemone *Bunodosoma cangicum*, may serve as a useful model to elucidate the cellular mechanisms of coral bleaching, and thus dispense with the collection of coral.

Our fluorescent analyses show that there is a noticeable increase in the carotenoid channel and concurrent drop in the chlorophyll a signal, as compared to the control signals, that results from the application of oxidative stress (Figure 8). This drop in chlorophyll a signal coupled to an increase in the carotenoid signal does not occur in any other experimental manipulation (Figures 8 and 9). We interpret these results to propose that we can experimentally induce significant bleaching without inducing any oxidative stress (Figure 9). These results indicate that oxidative stress is a bleaching

inducing stimulus that precedes the signaling molecules NO and cGMP in our putative pathway of algae expulsion from the host anemone.

To use our results to construct a plausible signaling pathway we would begin with heat induced oxidative stress and then move to activation of NO-synthase, which leads to NO signaling, which activates a soluble guanylyl-cyclase, which in turn activates the cGMP signaling of protein phosphorylations. We believe that caffeine in our studies may lead directly to protein phosphorylation and subsequent algae loss. However, the role of caffeine in our applications may be equivocal since caffeine is known to both increase $[Ca^{2+}]_i$ (Klein et al. 1992) and to effect protein phosphorylations through general inhibitions of phosphodiesterases, we are tentatively choosing the latter as the role of caffeine in our model to conform to the results of Sawyer and Muscatine, who have shown that caffeine produces bleaching in the anemone *A. pulchella* without an increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Sawyer & Muscatine 2001).

Acknowledgments

M.T.A. received a graduate fellowship from CAPES/CNPq. The authors would like to thank The Center for Electron Microscopy at the Federal University of Rio Grande (CEME-Sul FURG) for the use of the Leica SP8 confocal microscope.

5. Bibliography

Bouchard, J.N. & Yamasaki, H., 2008. Heat stress stimulates nitric oxide production in *Symbiodinium microadriaticum*: a possible linkage between nitric oxide and the coral bleaching phenomenon. *Plant and Cell Physiology*, 49(4), pp.641–652. Available at: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/pcp/pcn037>.

Douglas, A.E., 2003. Coral bleaching--how and why? *Marine pollution bulletin*, 46(4), pp.385–392. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X03000377>.

Downs, C.A. et al., 2002. Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free radical biology & medicine*, 33(4), pp.533–543. Available at:
<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12160935&retmode=ref&cmd=prlinks>.

Dunn, S.R. et al., 2002. Programmed cell death and cell necrosis activity during hyperthermic stress-induced bleaching of the symbiotic sea anemone *Aiptasia* sp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272(1), pp.29–53. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098102000369>.

Dunn, S.R., Schnitzler, C.E. & Weis, V.M., 2007. Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellatesymbiont release during cnidarian bleaching: every which way you lose. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1629), pp.3079–3085. Available at:
<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2007.0711>.

Fransolet, D., Roberty, S. & Plumier, J.-C., 2012. Establishment of endosymbiosis: The case of cnidarians and *Symbiodinium*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 420-421, pp.1–7. Available at:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098112000937>.

Hawkins, T.D. & Davy, S.K., 2013. Nitric oxide and coral bleaching: is peroxyxynitrite generation required for symbiosis collapse? *The Journal of experimental biology*, 216(17), pp.3185–3188. Available at:
<http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.087510>.

Hawkins, T.D. & Davy, S.K., 2012. Nitric Oxide Production and Tolerance Differ Among Symbiodinium Types Exposed to Heat Stress. *Plant and Cell Physiology*, 53(11), pp.1889–1898. Available at:

<http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/pcp/pcs127>.

Jokiel, P.L. & Coles, S.L., 1990. Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs*, 8(4), pp.155–162. Available at:

<http://link.springer.com/10.1007/BF00265006>.

Klein, M.G., Simon, B.J. & Schneider, M.F., 1992. Effects of procaine and caffeine on calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle.

The Journal of physiology, 453, pp.341–366. Available at:

[/pmc/articles/PMC1175561/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC1175561/?report=abstract).

Lesser, M.P., 2004. Experimental biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300(1), pp.217–252. Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098104000371>.

Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual review of physiology*, 68(1), pp.253–278. Available at:

<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>.

Marco Agustín, L.-C. et al., 2006. Correlation of chlorophyll a and total carotenoid concentrations with coral bleaching from locations on the Pacific coast of Mexico. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 39(4), pp.279–291.

Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10236240600976580>.

Merle, P.-L. et al., 2007. Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone. *Free radical biology & medicine*, 42(2), pp.236–246. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584906006691>.

Planchet, E., 2006. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *Journal of experimental botany*, 57(12), pp.3043–3055. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erl070>.

Safavi-Hemami, H. et al., 2010. Characterisation of Nitric Oxide Synthase in Three Cnidarian-Dinoflagellate Symbioses. *PLoS ONE*, 5(4), p.e10379. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010379.t001>.

Sawyer, S.J. & Muscatine, L., 2001. Cellular mechanisms underlying temperature-induced bleaching in the tropical sea anemone *Aiptasiapulchella*. *The Journal of experimental biology*, 204, pp.3443–3456. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11707495&retmode=ref&cmd=prlinks>.

Trapido-Rosenthal, H. et al., 2005. Increased zooxanthellae nitric oxide synthase activity is associated with coral bleaching. *Biological Bulletin*, 208(1), pp.3–6. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=15713806&retmode=ref&cmd=prlinks>.

Venn, A.A., Loram, J.E. & Douglas, A.E., 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of experimental botany*, 59(5), pp.1069–1080. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erm328>.

Weis, V.M., 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *The Journal of experimental biology*, 211, pp.3059–3066. Available at: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.009597>.

Williams, E.H., Jr. & Bunkley-Williams, L., 1989. The world-wide coral reef bleaching cycle and related sources of coral mortality. *Atoll Research Bulletin*, 335(335), pp.1–71. Available at: <https://repository.si.edu/handle/10088/5089>.

Zamoum, T. & Furla, P., 2012. Symbiodinium isolation by NaOH treatment. *The Journal of experimental biology*, 215, pp.3875–3880. Available at: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.074955>.

Discussão Geral

Durante a última década, o branqueamento crônico e agudo de cnidários que realizam relação simbiótica com algas fotossintetizantes, tem aumentado. O branqueamento, isto é, a perda de pigmento e a diminuição da densidade da população de algas simbióticas, tem sido correlacionado com aumento da temperatura da superfície do mar. (Gates, Baghdasarian, and Muscatine 1992). A liberação das algas simbióticas, oriunda da quebra da endossimbiose, ocasionada pelo branqueamento pode ocorrer de quatro formas segundo (Gates, Baghdasarian, and Muscatine 1992), as formas (figura 1): (1) exocitose das zooxantelas da célula hospedeira (resultando na liberação de células isoladas), (2) apoptose (resultando na liberação de zooxantelas associada com os restos da célula hospedeira), (3) necrose (resultando na liberação de zooxantelas associada com os restos da célula hospedeira), (4) desprendimento da células da alga da endoderme do hospedeiro (resultando em liberação das células intactas da alga).

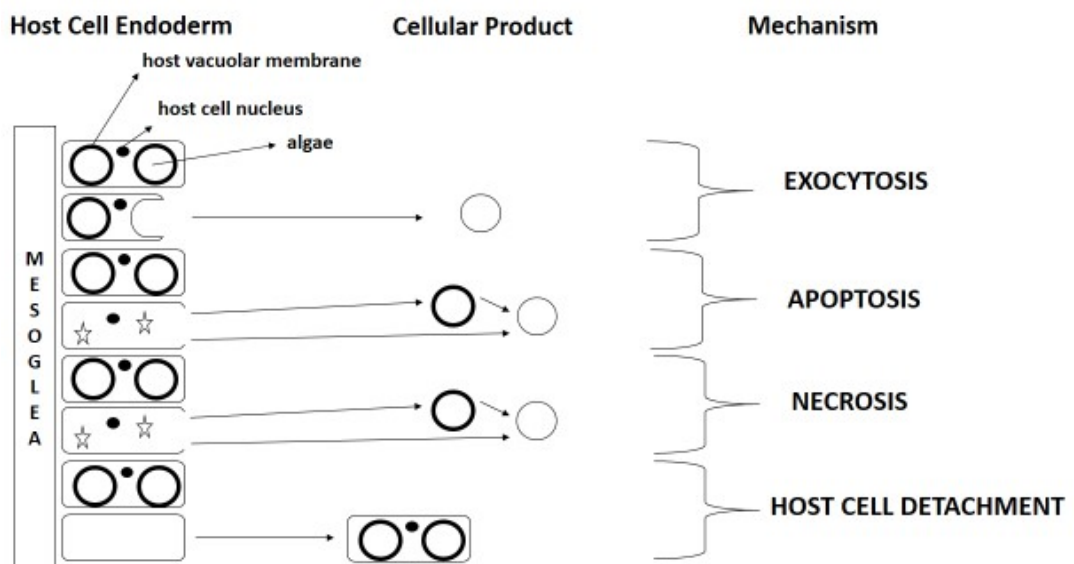


Figura 1– Representação esquemática dos potenciais mecanismos de liberação da alga simbiótica através da endoderme de cnidários (adaptado de Gates, Baghdasarian, and Muscatine 1992).

Nas figura 2 percebemos uma indução de branqueamento em decorrência do aumento da temperatura durante o período de 28 dias. Vemos que a temperatura prejudica a simbiose de alguma forma. Vemos na figura 3, o grupo controle de temperatura, e como sua variação é bem pequena (aproximadamente 10%) em termos de relativa viabilidade simbiótica. Podendo ser uma alteração normal apenas em decorrência da aclimação em laboratório (DAVID J. SMITH 2005).

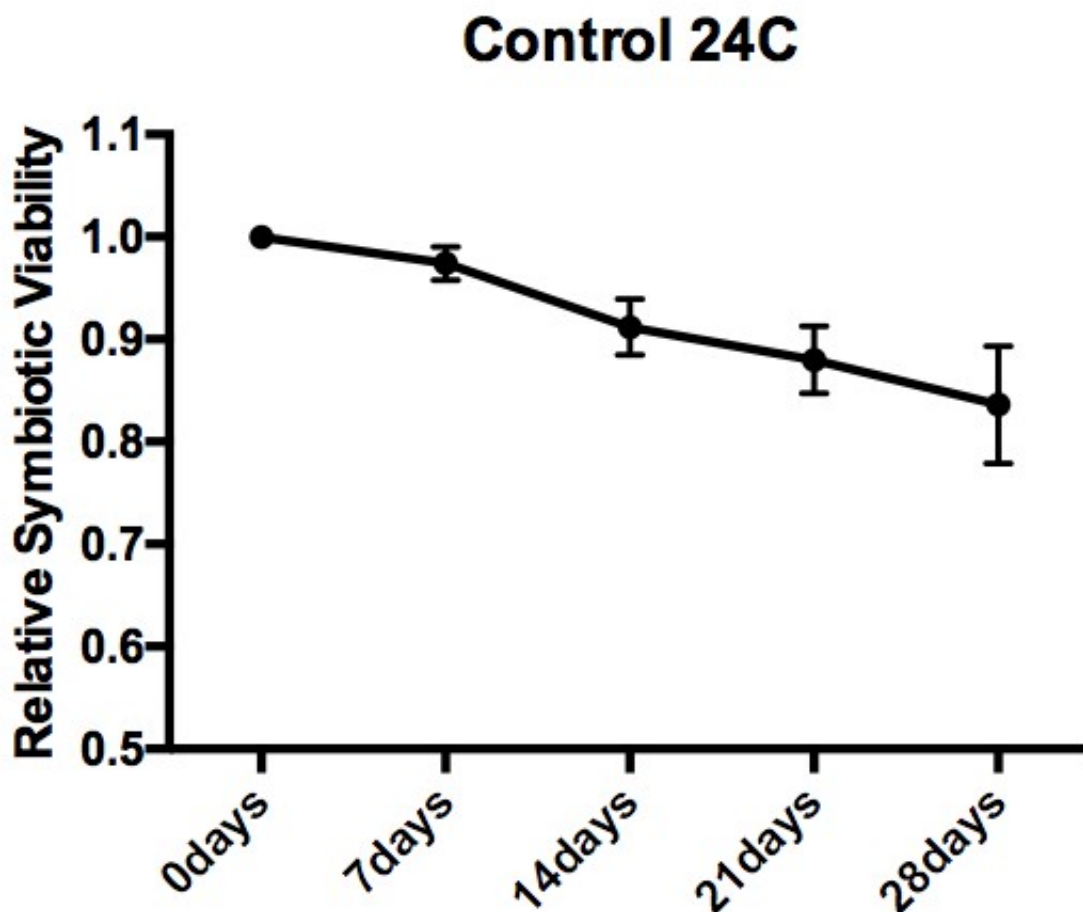


Figura 3 - Viabilidade simbiótica relativa dos espécimes de *B. cangicum* mantidas em condições laboratoriais constantes de temperatura e luminosidade, o declínio foi gradualmente, cerca de 90% ao longo de um mês. Os dados apresentados são médias ± SEM, N = 5.

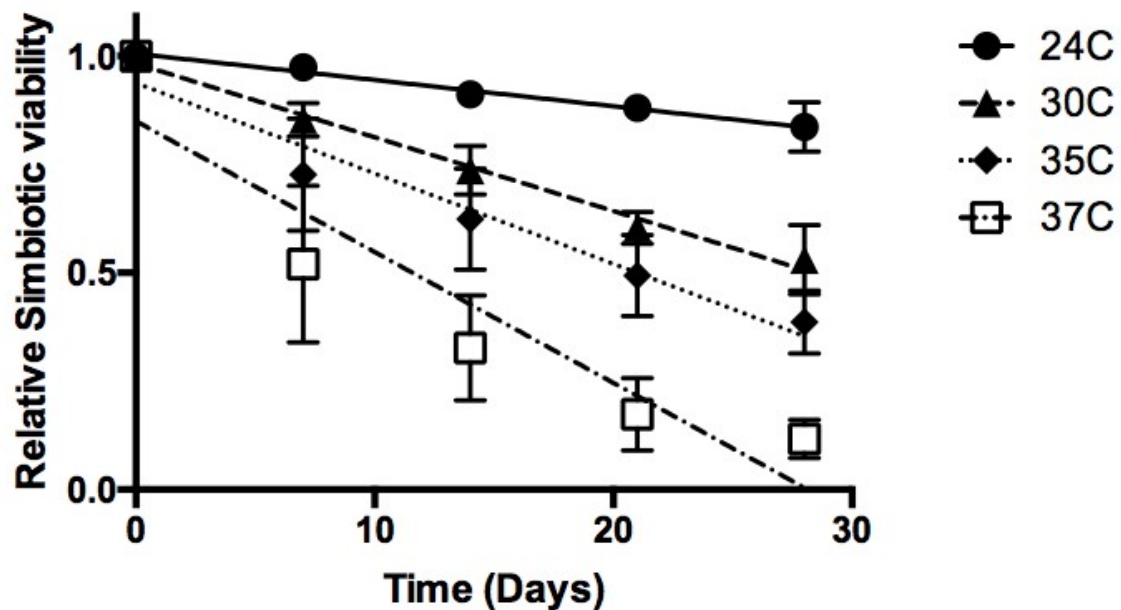


Figura 2 - Viabilidade simbiótica relativa dos espécimes de *B.cangicum*, houve declínio nas taxas com aumento da temperatura. As taxas lineares são significativamente diferentes entre as temperaturas testadas, $P < 0,01$. Os dados apresentados são médias \pm SEM, $N = 5$.

Podemos discutir duas vias que não necessariamente ocorrem isoladas uma da outra, nas quais a temperatura acarreta em branqueamento. A primeira é que o aumento da temperatura afeta a adesão celular da alga na endoderme do hospedeiro. Podendo ser por alterações nas concentrações de cálcio intracelular.

Gates e colaboradores (Gates, Baghdasarian, and Muscatine 1992) demonstraram um branqueamento térmico no coral *Pocillopora damicornis* e na anêmona de mar *Aiptasia pulchella*, que ocorreu predominantemente por liberação de células hospedeiras intactas contendo alga simbiótica, de alguma forma o estresse térmico afeta as propriedades adesivas das células hospedeiras. (S J Sawyer and Muscatine 2001) sugerem que a necrose de tecidos pode explicar branqueamento, mas esses autores também observaram algas intactas sendo ejetadas ainda dentro de células

hospedeira. Especula-se que choque térmico pode induzir a liberação de algas através de exocitose, depois de ter mostrado que choque térmico altera as concentrações de cálcio intracelular, no coral *Acropora* (S J Sawyer and Muscatine 2001). No entanto a disfunção da adesão celular não é o único mecanismo induzido por temperatura que leva ao branqueamento. Mas já foi visto que anêmonas e corais durante o evento de branqueamento podem liberar células intactas contendo alga simbiote. O estresse térmico de alguma forma alteram as propriedades adesivas, das células. Uma possível explicação poderia ser necrose dos tecidos em função do branqueamento. Mas alguns estudos observaram algas liberadas ainda das células hospedeiras.

Alguns estudos sugerem, que o branqueamento, induzido pela temperatura, em cnidários simbióticos, pode ser um resultado do desprendimento, e perda de células hospedeiras contendo algas simbióticas. Uma das hipóteses é que o desprendimento da célula hospedeira, se dá através de um evento termotrópico de membrana que acarreta num aumento na concentração de cálcio intracelular. Esse colapso fisiológico na homeostase do cálcio poderia afetar a estrutura do citoesqueleto responsável pela aderência celular e perturbar a mesma (S J Sawyer and Muscatine 2001).

Alterações na concentração de cálcio pode causar perda da adesão celular, devido ao colapso do citoesqueleto, este qual é interconectado com o domínio citoplasmático de moléculas responsáveis pela adesão celular (Boyle and Lieberman 1999). Portanto mudanças nos níveis de cálcio intracelular, podem induzir disfunção da adesão celular.

A outra via a ser explanada é que altas temperaturas e altos níveis de radiação ultravioleta aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Acarretando, (a) dano a fotossistema II da alga simbiótica, (b) oxidação de membrana e (c)

desnaturação proteica. O que induz ao branqueamento. Estresse térmico e altos níveis de UV podem desestabilizar a cadeia transportadoras de elétrons do sistema fotossintético, com isso acontece um aumento na taxa de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Na figura 4 vemos que o peróxido de hidrogênio afeta a viabilidade simbiótica. Que após 60 minutos de exposição, já ocorre diminuição na densidade da alga. Na figura 5 vemos uma diminuição nos níveis de fluorescência da clorofila, provavelmente por um dano das ROS na alga, seja por oxidação de membrana, desnaturação proteica ou dano fotossintético. Já os níveis da fluorescência de carotenoides são maiores no grupo tratado que no controle. Isso é plausível, pois o organismo possui uma segunda linha de defesa não enzimática para lidar com a produção de ROS, que são antioxidantes não enzimáticos. Carotenoides são reconhecidos como capazes de remover ROS de uma gama de organismos aquáticos (Marco Agustín et al. 2006) . Cnidários usam antioxidantes, como carotenoides para lidar com ROS oriundo, do aumento de temperatura e radiação ultravioleta, assim evitando dano fotossintético e diminuição na densidade alga, o que pode diminuir a incidência de branqueamento (Liñán-Cabello et al. 2010) .Como o tempo de exposição foi so de 60 minutos, o organismo conseguiu lidar, e o aumento de carotenoides pode ter feito parte dessa resposta antioxidante.

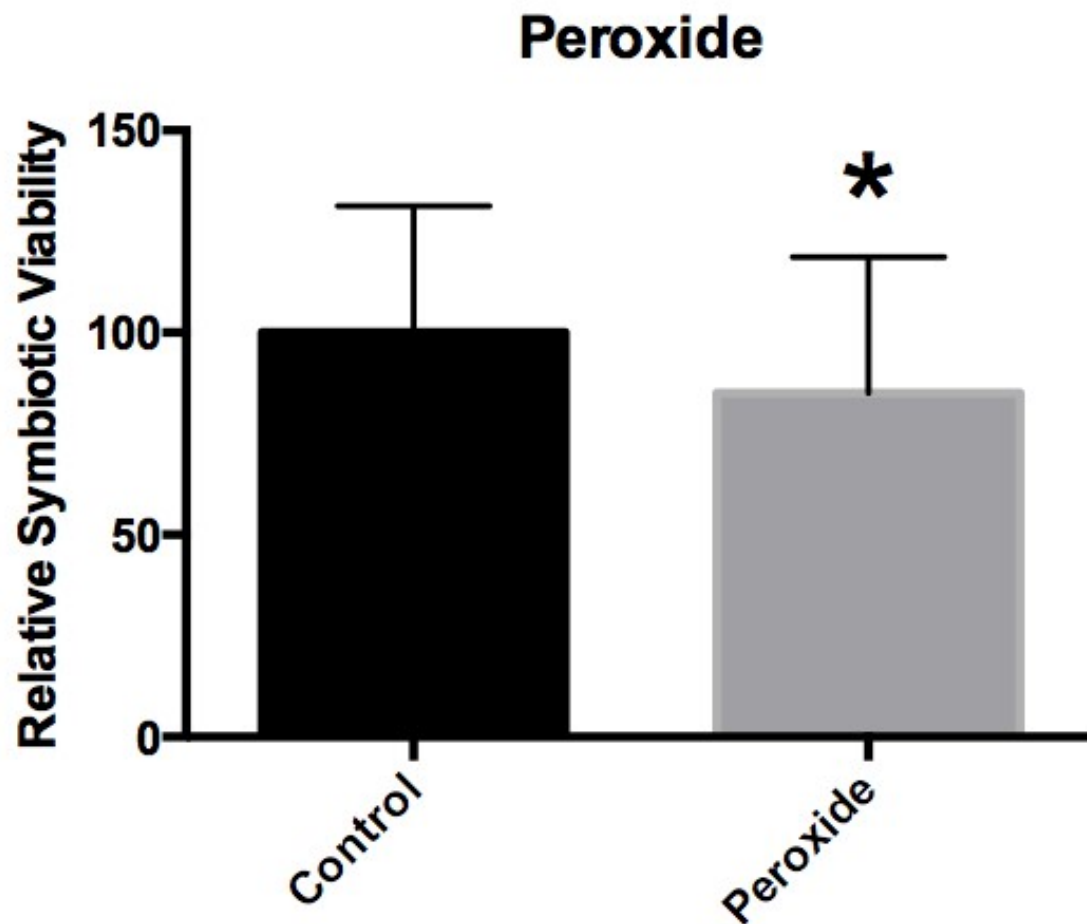


Figura 4 - Animais inteiros expostos a peróxido de hidrogénio a 5 mM durante 1 hora a experiência de um pequeno mas significativo declínio nas Relativa Viabilidade simbiótica. Os grupos foram comparados por um teste-t emparelhado, $P = 0,002$. Os dados apresentados são médias \pm SEM. $N = 7$.

Algal Fluorescence Analysis (Peroxide)

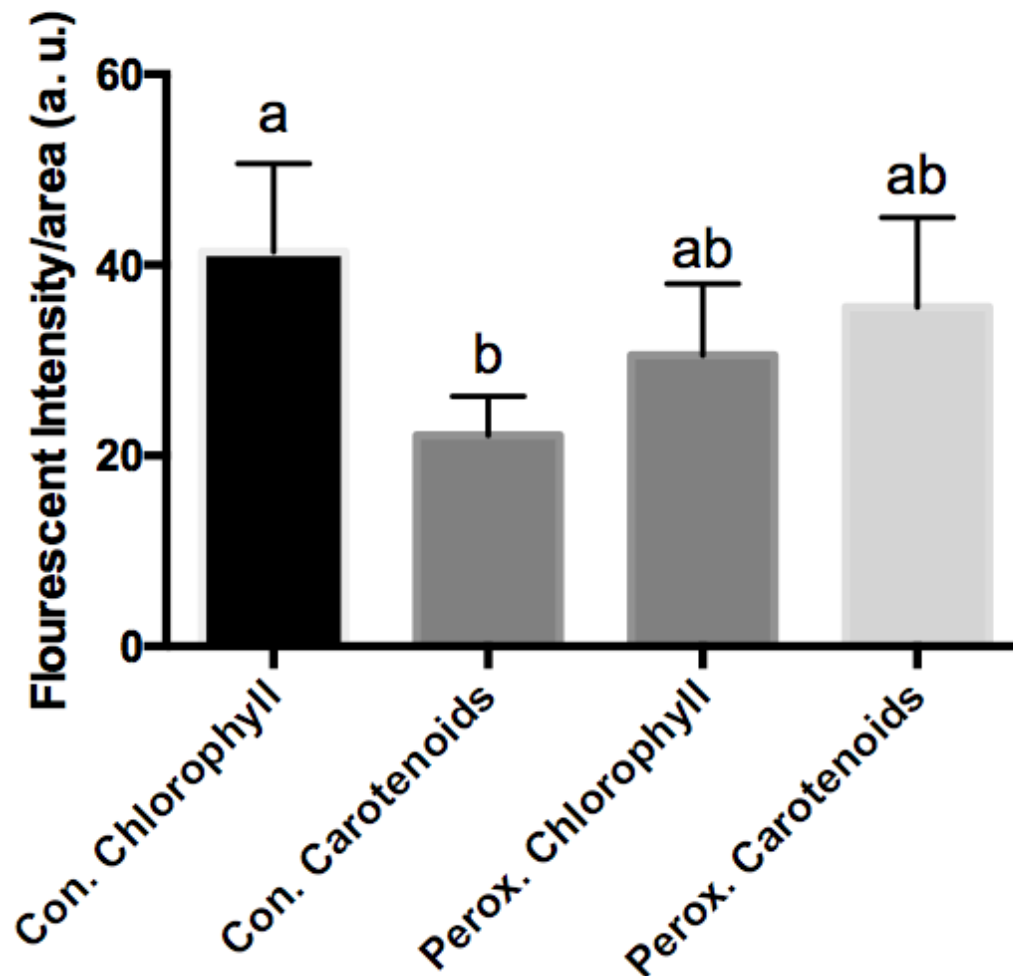


Figura 5 - Análise de variância dos sinais fluorescentes derivados de tentáculos intactas de *B. cangicum*, comparando o controle e peróxido (5 mM, 1 hora). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do pós-teste de Tukey, $p = 0,01$, $N = 7$. Os dados apresentados são médias \pm SEM.

A produção de ROS ocorre no cloroplasto por vários mecanismos associados com o fotossistema I e a catalisação da transferência de elétrons do fotossistema II, a reação mais notável é de Mehler e a geração de peróxido de hidrogênio a partir do uso de oxigênio no complexo. Propõe se que o peróxido de hidrogênio produzido pela alga simbiote difunde-se até o citoplasma do hospedeiro (figura 6) (Downs et al. 2002).

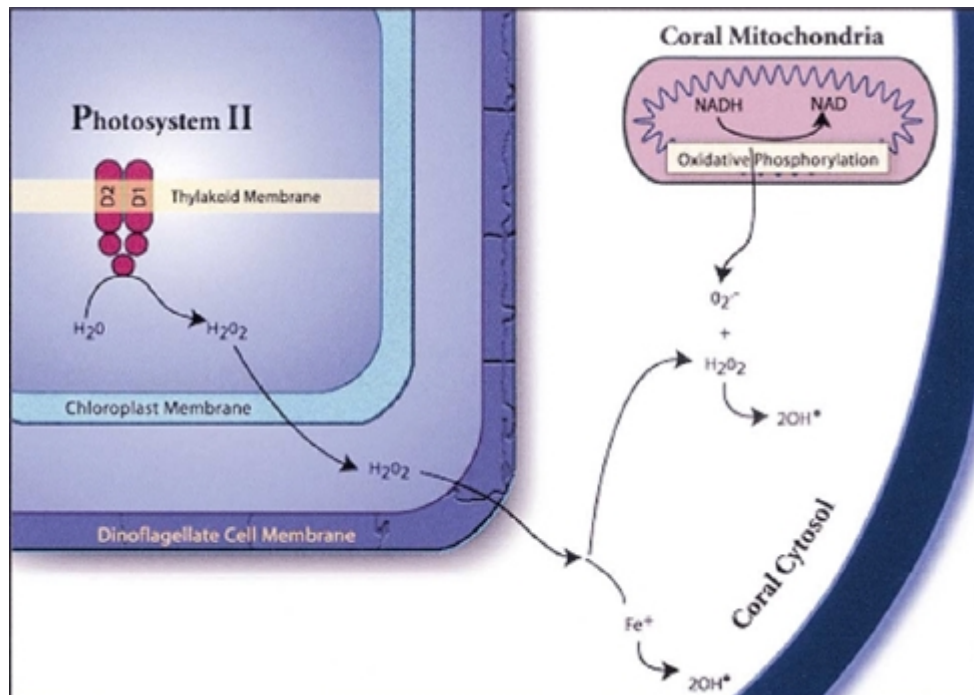


Figura 6 - Esquema do modelo proposto da teoria do branqueamento em corais, através de estresse oxidativo, resultante do aumento da temperatura dos mares (adaptado (Downs et al. 2002).

Uma vez dentro do citoplasma o peróxido de hidrogênio pode seguir dois caminhos, ou ser neutralizado pelo sistema antioxidante do hospedeiro, organismos endossimbiontes possuem defesas naturais antioxidantes, devido a exposição de oxigênio com que lidam, tanto do ambiente, como da fotossíntese da alga simbiote (Sandeman 2006). Caso o sistema antioxidante seja ineficiente em frente a quantidade de peróxido de hidrogênio, esse mesmo, passa para uma forma mais nociva, o radical hidroxila, essa transformação ocorre através da reação de Fenton ou Haber-Weiss. Basicamente podemos afirmar, que em baixas concentrações de ROS o sistema antioxidante do organismo da conta de neutraliza-lo. Já em altas concentrações acima do limiar que o sistema antioxidativo tem a capacidade lidar, ROS vai causar dano oxidativo, em contrapartida o hospedeiro vai tentar erradicar a fonte de ROS, e vai expulsar a alga simbiote. podendo se afirmar que a teoria oxidativa do branqueamento de cnidários

propõe que o branqueamento pode funcionar como a defesa final do hospedeiro em relação a tensão oxidativa provocada pela alga (Downs et al. 2002).

Correlações entre os eventos mundiais de branqueamento e o aumento da temperatura da superfície do mar, sugerem que altas temperaturas podem desencadear estresse oxidativo ao cnidários endossibiontes, resultando em um evento de branqueamento (Sandeman 2006).

Desestabilização do fotossistema II em decorrência do aumento da temperatura, ocorre, em parte, pela deterioração do ciclo de evolução do oxigênio. Um mecanismo que compromete o ciclo de evolução do oxigênio está associado com a liberação de manganês e cloro do complexo de evolução do oxigênio, e a dissociação das proteínas OEC18, OEC24, e a heme catalase associada a fotossistema II. O resultado é um aumento considerável das taxas de peróxido de hidrogênio. Estresse por calor pode agravar ainda mais o potencial do peróxido de hidrogênio, aumento os níveis de estresse oxidativo (Downs et al. 2002). A difusão do peróxido de hidrogênio para fora do cloroplasto e em contatos com as organelas dos dinoflagelados, e para o citoplasma dos cnidários, pode resultar em um dano oxidativo ao longo de toda simbiose, especialmente organelas que possuem alto teor de ferro ou estão associadas com a produção de super oxido, como por exemplo as mitocôndrias. Em resposta a esse estresse oxidativo, hospedeiro expele a alga, resultando no branqueamento (Downs et al. 2002; Weis 2008a)

A variação nas taxas de branqueamento está intimamente ligado com alguns mecanismos moleculares específicos responsáveis por lidar com as espécies reativas de oxigênio, afim de neutralizar ou diminuir o dano e os efeitos par endosimbiose. Aumento nos níveis da SOD cobre e zinco pode ser associado com o limite no qual

ocorre dano oxidativo, isto devido a redução de substratos disponíveis para a reação química de Haber-weiss. Outros mecanismos protectivos incluem vias antioxidantes, como as vias Asada-Halliwell e o ciclo das xantofilas, também podem ocorrer mecanismos preventivos como a produção de pequenas proteínas de choque térmico e mudanças na composição lipídica (Downs et al. 2002). O branqueamento e todos os processos envolvidos, não possuem apenas uma via de indução. É necessário entender todas as peças do jogo. E como suas diferentes interações podem dar ou não o mesmo resultado. É necessário ter uma visão ampla para entender a dinâmica envolvida.

Como dito a temperatura pode interferir nos níveis cálcio intracelular. Mas qual sua implicância para o branqueamento? Testamos essa via usando cafeína, e como visto na figura 7 e 8 C, a cafeína tanto provocou uma expulsão da alga, diminuindo, quanto diminuiu os níveis de fluorescência de clorofila e carotenoides. O que mostra uma indução ao branqueamento. Mas como entender essa dinâmica?

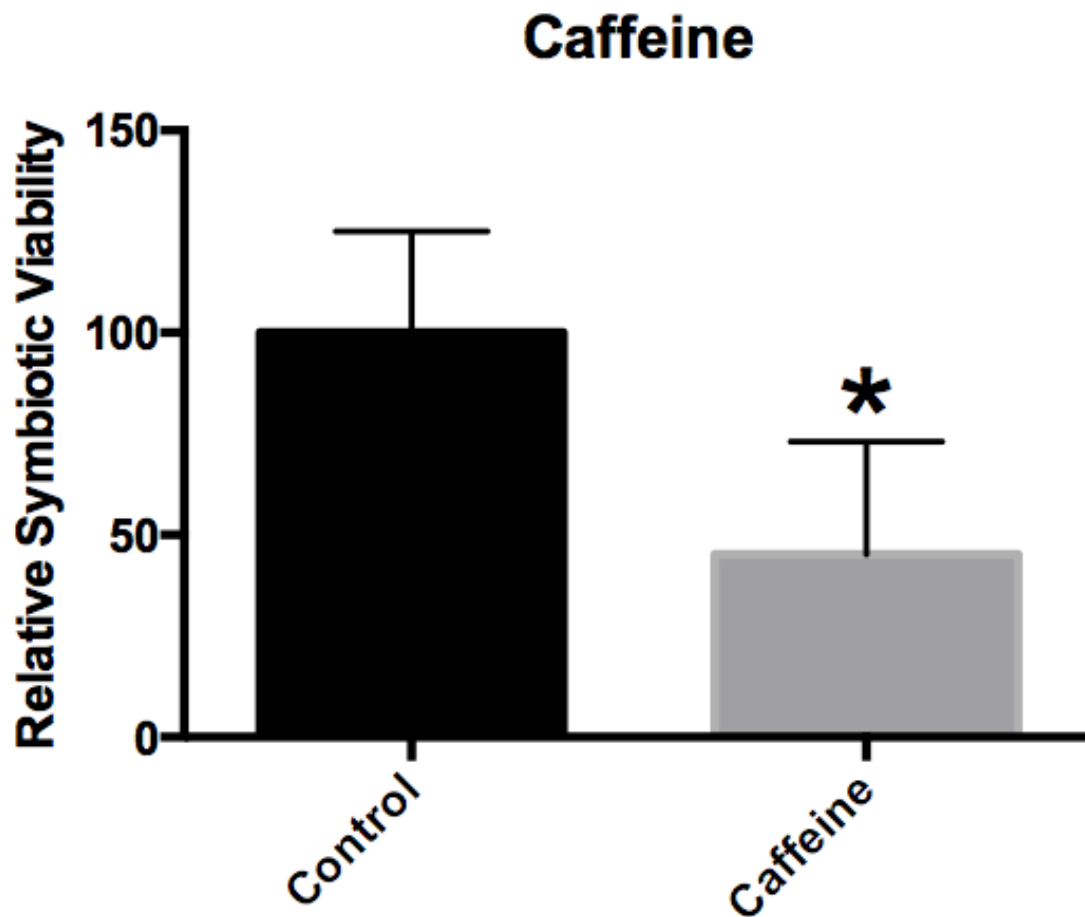
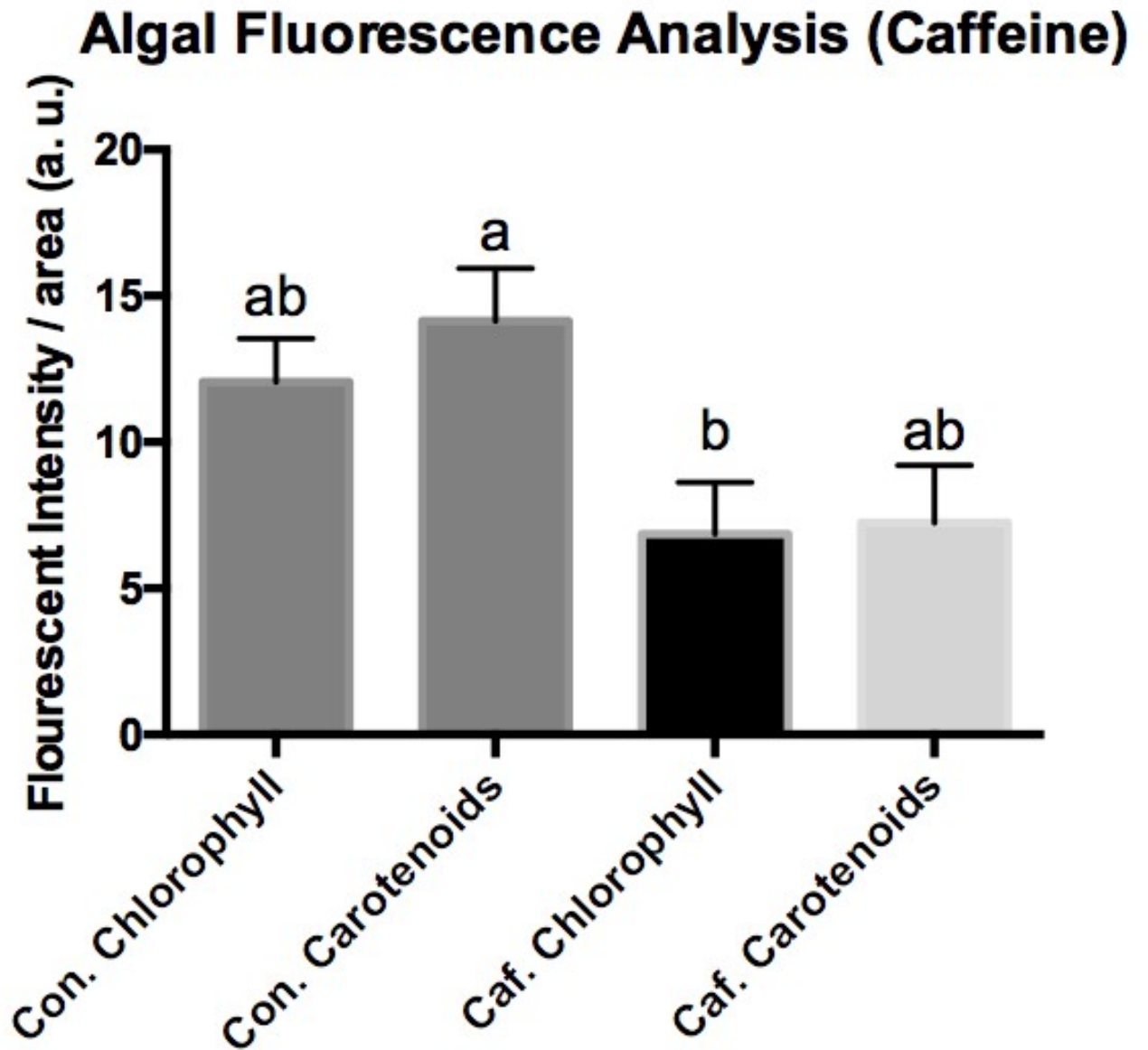
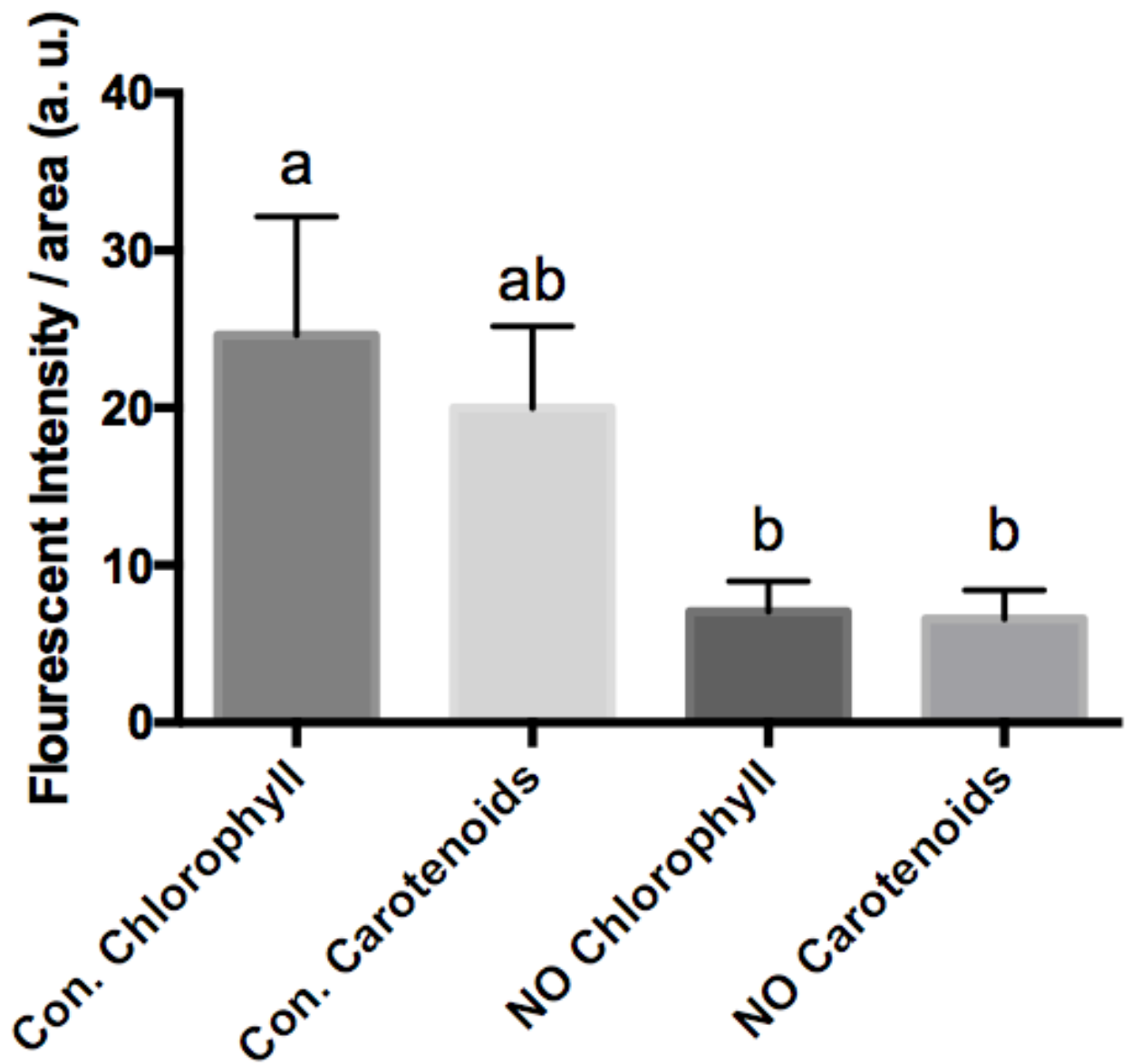


Figura 7 - Animais inteiros expostos à cafeína 5 mM durante 1 hora a experiência de um grande declínio significativo na Relativa simbiótica Viabilidade. Os grupos foram comparados por um teste-t emparelhado, $P = 0,03$. Os dados apresentados são médias \pm SEM. $N = 8$.



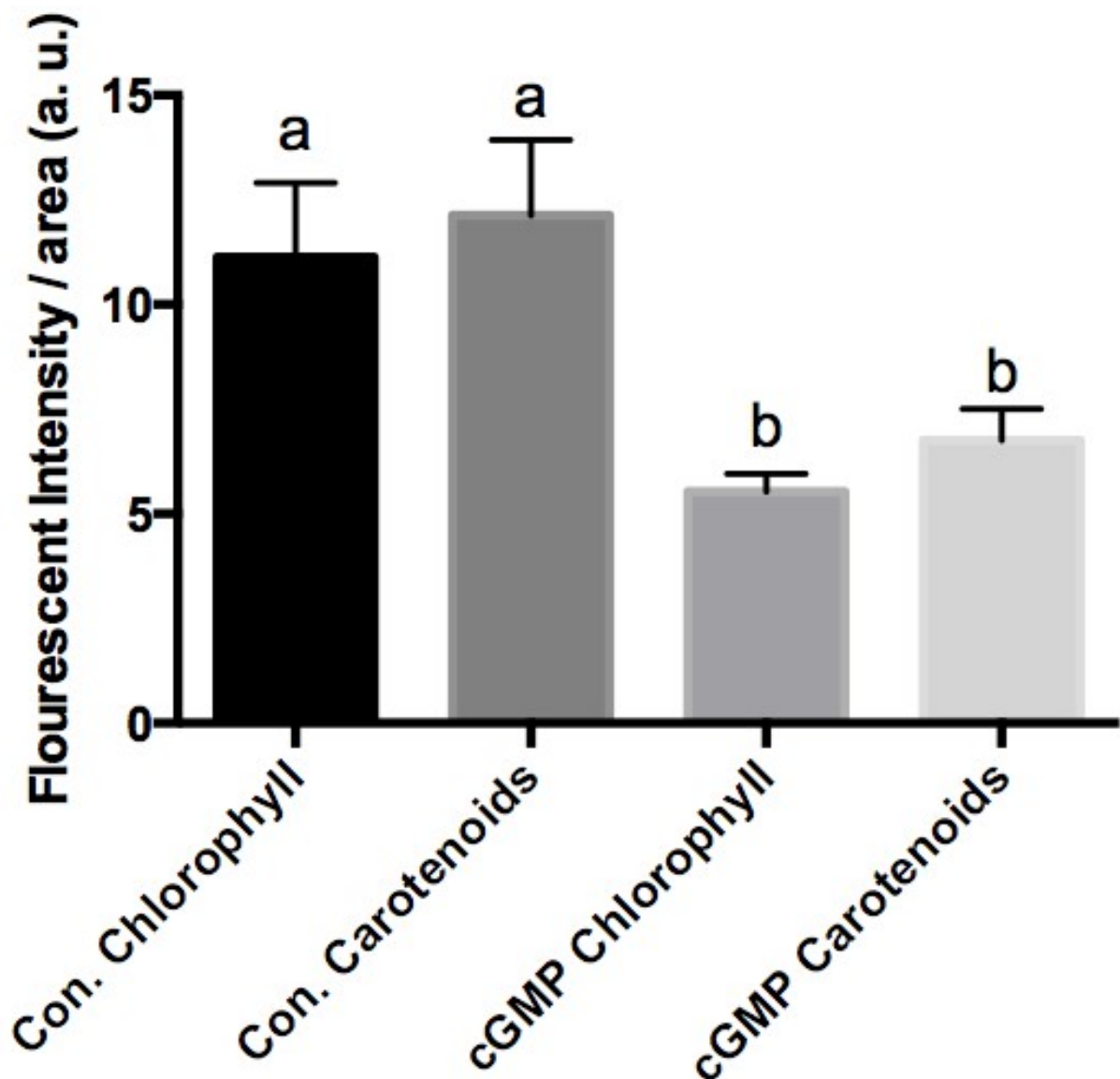
1. Figure 8 A

Algal Fluorescence Analysis (NO)



2. Figure 8 B

Algal Fluorescence Analysis (cGMP)



3. Figure 8 C

Figura 8- ANOVA de uma via, análise de variância dos sinais fluorescentes derivados de tentáculos intactas de *B. cangicum*, comparando o controle e cafeína (5 mM, 1 hora). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do pós-teste de Tukey, $P = 0,02$, $N = 6$. Os dados apresentados são médias \pm SEM (A). One-way análise de variância dos sinais fluorescentes derivados de tentáculos intactas de *B. cangicum*, comparando o controle e nitroprussiato (1 mM, 1 hora). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do pós-teste de Tukey, $P = 0,02$, $N = 6$. Os dados apresentados são médias \pm SEM (B). Uma vias

análise ANOVA dos sinais fluorescentes derivadas de tentáculos intactas a partir de *B. cangicum*, controlo e comparando dibutrylcGMP (25 uM, 1 hora). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos do pós-teste de Tukey, $P = 0,004$, $N = 8$. Os dados apresentados são médias \pm SEM (C).

Começamos pelo fato que a cafeína tem a capacidade de induzir liberação de cálcio das reservas intracelulares. Bem como afetar proteínas, alterando seus níveis de fosforilação, assim podendo causar descolamento da célula hospedeira em *A. pulchella* sem afetar as concentrações de cálcio (Boyle and Lieberman 1999; Klein, Simon, and Schneider 1992). Segundo (S J Sawyer and Muscatine 2001), quanto maior o tempo de exposição a cafeína, maior a liberação de algas intactas dentro das células e portanto induzindo o branqueamento. Isto por que acontece maior liberação de proteínas em função da liberação de cálcio acarretando uma desintegração da endoderme. Isto sugere que branqueamento induzido por temperatura em cnidários altera a fosforilação da proteína do hospedeiro e, por este mecanismo, induzem a perda de células hospedeiras. (Klein, Simon, and Schneider 1992; Hermansen, Arvedlund, and Fiedler 2005; DAVID J. SMITH 2005)

Essa interferência na homeostase do cálcio por si só, poderia causar branqueamento, como já foi dito, o cálcio está ligado a adesão celular, esta que pode ser alterada pela temperatura. Mas a outra linha sinalizatória a ser entendida, que também pode acarretar o branqueamento. A liberação de cálcio induzida pela cafeína, faz com que esse cálcio se ligue na calmodulina e desencadeie a produção de óxido nítrico.

A síntese fisiológica do óxido nítrico é realizada pela óxido nítrico sintase (NOS). A NOS é o primeiro elemento da via de sinalização entre NO e cGMP. São três as isoformas da NOS, são elas: NOSI, NOSII e NOSIII. Todas as isoformas são homodímeros que partilham homologia na sua metade C-terminal, denominado

"domínio redutase," para a redutase do citocromo P450. A metade N-terminal da enzima denominado o "domínio heme oxigenase " contém o local de ligação para o grupo heme e substrato de L-arginina. Além de oxigênio, L-arginina, e o grupo prostético heme, catálise do NO requer que a forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), adenina flavine (FAD), o mononucleótido e (FMN), bem como tetra-hidrobiopterina, todos que são ligados ao enzima. Vários análogos de L-arginina são amplamente utilizados como inibidores competitivos e irreversíveis das enzimas NOS. Sua administração é utilizado como um dos testes de chave para determinar o envolvimento do NO-dependente vias em processos investigados (Greene, and Shaw 1972; Mural et al., 1979; Murad 1986; Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987).

Todas as NOS contêm uma sequência de consenso entre o domínio redutase e oxigenase, capaz desse ligar na calmodulina. A transferência de elétrons entre o domínio redutase e oxigenase é regulada pela ligação de calmodulina. NOSI e isoformas NOSIII se ligam à calmodulina somente após um aumento intracelular da concentração de calcio de > 500 nm. Em condições normais, muitas interações com receptores agonistas resultam em uma transição transmembrana dos fluxos de cálcio ou liberação de cálcio a partir de compartimentos de armazenamento. A natureza transitória de tais fluxos determina a produção de NO pela NOSI e NOSIII, e é necessário para sinalização fisiológica através das vias NO/cGMP (Wink, and Mitchell 1998; Wink et., al 2001).

Interação da calmodulina e a isoforma NOSII, no entanto, pode ocorrer em repouso, devida a baixa concentração necessária de calcio < 100 nm, o que torna a isoforma NOSII independente das alterações nas concentrações de calcio intracelular.

NOSII é completamente ativa e capaz de gerar grandes fluxos de NO logo depois a sua síntese. No entanto, esta prolongada síntese de NO não resulta em um aumento significativo dos níveis de cGMP intracelular, que poderia ser prejudicial. As enzimas NOS exibem várias localizações subcelulares. Originalmente descrito principalmente o compartimento citosólico, a enzima NOSI foi posteriormente detectado numa forma ligada à membrana. Como os fluxos de cálcio são transitórios, portanto em condições normais, a produção de NO se dá através da NOSI e NOSIII dependente de cálcio. Para preservar e amplificar o sinal original, o NO mensageiro recruta o próximo jogador da cascata de sinalização NO/cGMP, a Guanilato ciclase solúvel (sGC), que funciona como um interruptor para o segundo mensageiro cGMP. A sGC é um membro da grande família de proteínas receptoras. Após sua ativação com vários ligantes, lhe permitindo aumentar sua habilidade catalítica de sintetizar cGMP a partir de GTP. A sGC foi originalmente identificada como uma guanilato ciclase ativada na fração citosólica a partir da lise de células e tecidos. Essa atividade citosólica se diferencia da atividade da guanilato ciclase ligada a membrana, por sua resposta ao cálcio, ATP, detergentes e cinética da síntese de cGMP. No entanto a principal diferença da atividade da GC citosólica para a sGC, é sua ativação por nitroprussiato de sódio, nitroglicerina, azida, hidroxilamina e óxido nítrico. Com essas descobertas foi possível postular e depois confirmar em diversos sistemas, que o NO é o ativador fisiológico da sGC. Essa ativação dependente de NO da sGC, e o interruptor acoplado da mensagem NO para o cGMP é o passo chave na via sinalizatória NO/cGMP. Exposição da enzima sGC para doadores de NO, transformam uma enzima deficiente e ineficaz, com baixa saída de cGMP (atividade específica de 0,01 a 0,1 micromole de cGMP/ min/ mg/ sGC) em uma enzima com atividade específica centenas de vezes

maior (atividade específica de 10 a 35 micro mole de cGMP/ min/ mg/ sGC) (Ignarro et al 1981; Stone et al 1994; Martin et al 2003; Koesling et al 1999)

É amplamente aceito que uma diminuição na concentração de cálcio do mioplasma (myoplasmic) é um pré requisito para o relaxamento das células musculares lisas (SMC). Expulsão de cálcio através da membrana plasmática foi um dos primeiros mecanismos de relaxamento do SMC dependente de NO/cGMP a ser elucidado. Doadores de NO e análogos de cGMP, aumentam significativamente dependência de sódio e efluxo de cálcio, através da ativação da bomba sódio e potássio ATPase. O efeito resultante da via sinalizatória NO / cGMP na morte celular programada (apoptose), depende largamente a concentração de NO sintetizado, tipo de célula, e o mecanismo de indução a apoptose. O NO pode inibir a sinalização de caspases através nitrosação direta, dos resíduos de cisteína chave. Além de inibição direta das caspases, NO afeta processos apoptóticos através da sinalização NO/cGMP. A diversidade dos processos dependentes da via NO/cGMP implica no múltiplo controle de mecanismos internos de vários processos envolvidos nessa sinalização. Além da degradação de cGMP, devido a ativação da fosfodilserase dependente de cGMP, vários outros processos de auto regulação tem sido estudados. A enzima NOS está sujeita a auto inibição, seja por adição exógena de NO quanto por produção endógena de NO pela NOS, inibindo significativamente a liberação de NO. O mecanismo mais provável desta inibição é a ligação de NO a porção heme cataliticamente crucial para o funcionamento da enzima, indicando um mecanismo clássico de inibição da enzima pelo produto da reação. Estudos in vitro sobre enzima sGC purificada demonstraram algum nível de inibição da sGC da reação pelos produtos do pirofosfato e do cGMP (Lamas and Cadenas 2006).

Podemos resumir o processo assim: guanilato ciclase solúvel, pela produção de NO a partir das enzimas NOS, aumentam os níveis intracelulares de cGMP. Através do

recrutamento de varias moléculas, cGMP- efetoras. Uma quantidade enorme de processos podem ser afetados pela via NO/ cGMP. Efeitos paracrinos e autocrinos da via NO/cGMP tem uma ampla gama de efeitos fisiológicos e fisiopatológicos. Assim podendo afirmar que a síntese de cGMP é dependente de NO.

Toda essa via sinalizatoria tem papel importante no evento do branqueamento. Tanto que percebemos essa respostas olhando as figuras 9,10, 8 A e 8 B. Vemos que oxido nítrico e cGMP. Induzem branqueamento. Diminuem a densidade da alga, e também os níveis de fluorescência de clorofila e carotenoides, que são componentes importantes da algas. Mostrando que alga foi expulsa do simbionte. Como já dito não existe uma via única. O branqueamento pode ter ocorrido por quebra da adesão celular em decorrência da quebra da homeostase do cálcio, o que acarretou um desprendimento da célula intacta ou apoptose induzida pelo oxido nítrico (figuras 1, 11 e 12).

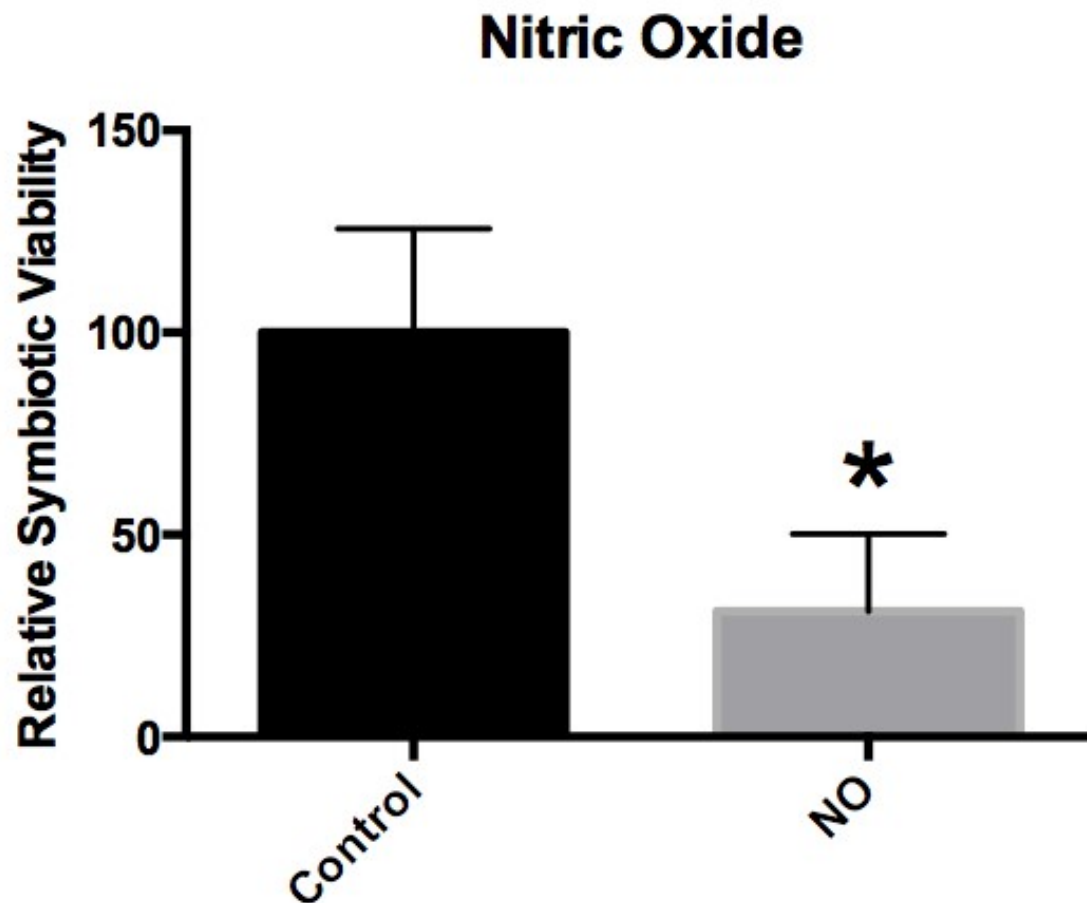


Figura 9 - Animais inteiros expostos a nitroprussiato 1 mM durante 1 hora a experiência de um grande decréscimo significativo na viabilidade Relativa simbiótica. Os grupos foram comparados por um teste-t emparelhado, $P = 0,01$. Os dados apresentados são médias \pm SEM. $N = 8$.

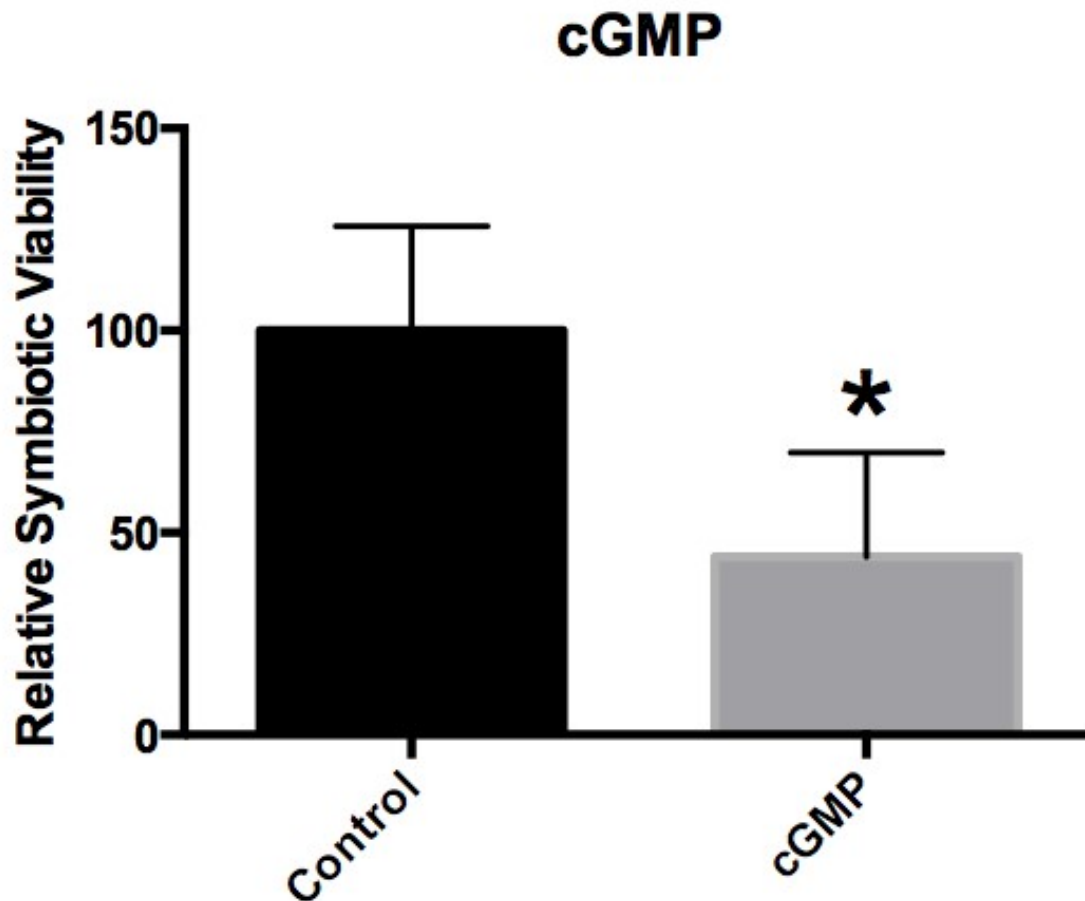


Figura 10 - Animais inteiros expostas a 25 mM dibutirilcGMP durante 1 hora experiência uma grande diminuição significativa na viabilidade Relativa simbiótica. Os grupos foram comparados por um teste-t emparelhado, $P = 0,02$. Os dados apresentados são médias \pm SEM. $N = 8$.

O trabalho de (Hawkins, Bradley, and Davy 2013a) com a anêmona do mar *Aiptasiapulchella* fala do papel no óxido nítrico no branqueamento, e como o NO está envolvido nas vias apoptóticas responsáveis pela quebra da simbiose, isto por que foi identificado por que teve um aumento nas atividade das enzimas caspases que medeiam as vias apoptóticas e podem ser reguladas por NO. E como já vimos aumento de temperatura pode desencadear uma via complexa que induz síntese de NO. Outra possibilidade é que o aumento de NO do hospedeiro seja uma resposta imune inata, para que ele possa induzir apoptose e possa expulsar a alga, como já foi dito em algumas

situações no branqueamento, é mais vantajoso para o hospedeiro expulsar a alga para poder diminuir o dano oxidativo que ela proporciona em funções da geração de ROS em decorrência do aumento de temperatura (Downs et al. 2002). Já é bem aceito que o branqueamento causa uma fotoinibição da alga, gerando ROS em níveis maiores que a capacidade de administração do organismo.

Outra possibilidade para que o NO cause quebra da simbiose, é que ele seja citotóxico para algas simbiontes. Na últimas décadas muitos trabalham tentam elucidar essa questão (Hawkins and Davy 2013a; Hawkins, Bradley, and Davy 2013b) . De que o NO cause efeitos tóxicos para com a alga, e isso faça diminuir sua densidade e assim ocasionar branqueamento. A indução de óxido nítrico também pode se dar pelo aumento da temperatura, visto que a liberação de cálcio intracelular em decorrência de temperaturas maiores, pode dar início a maior síntese de NO, podemos ver essas relação na figura 11 e 12.

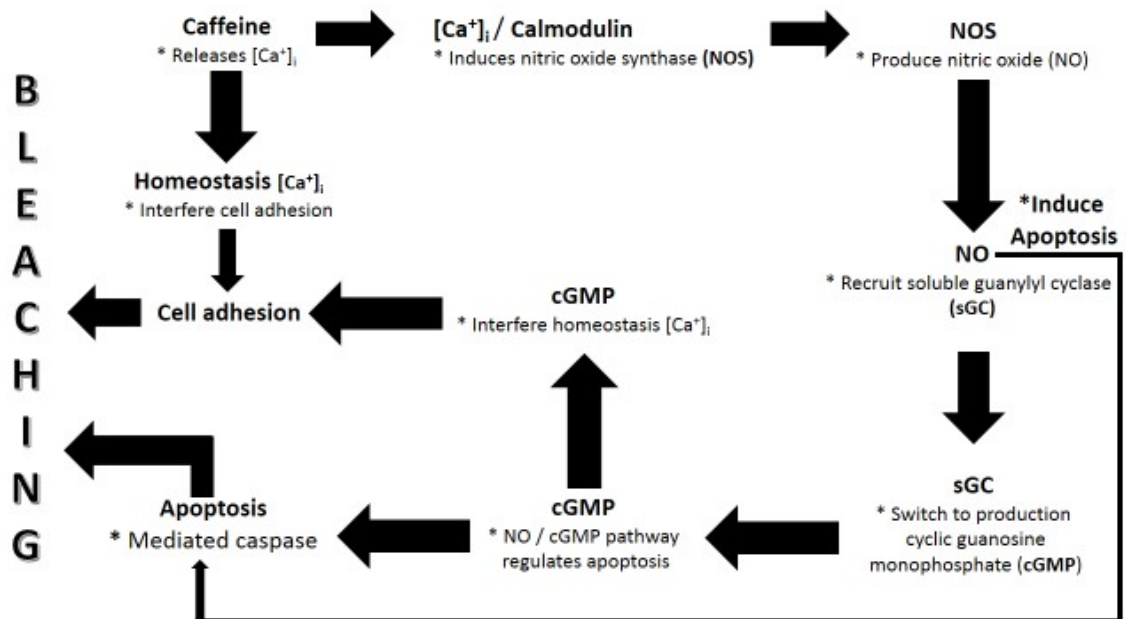


Figura 11 - esquema das vias sinalizadoras testadas no presente e estudos e como elas podem levar ao branqueamento.

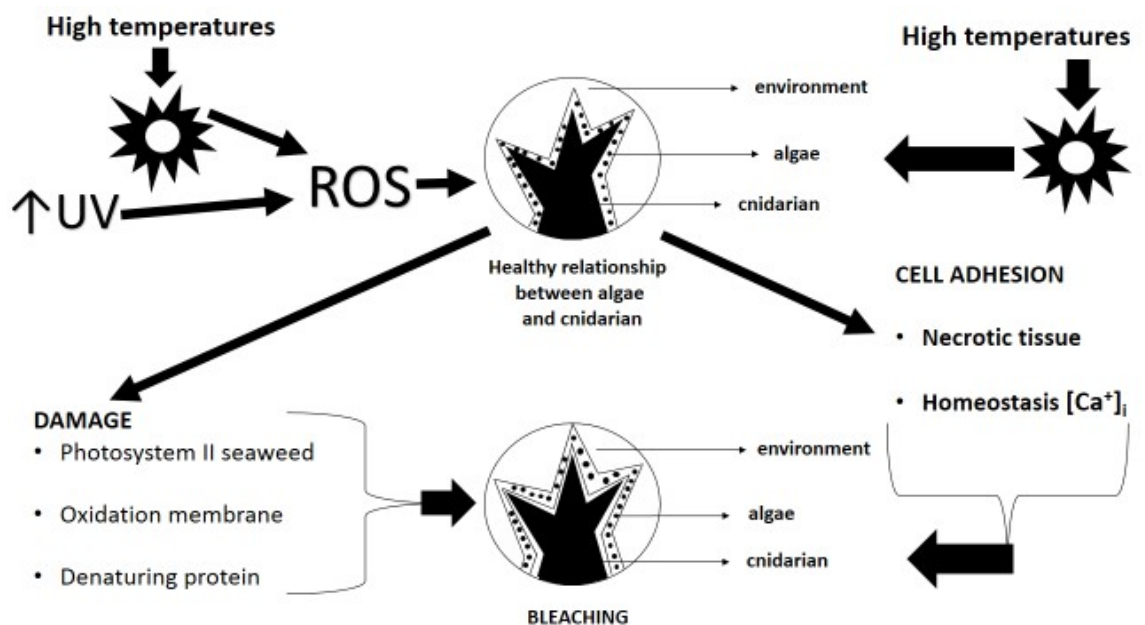


Figura 12 - Esquema de como aumento de temperatura pode levar ao branqueamento.

Conclusão Geral

Todas as vias testadas e exploradas nesse trabalho podem em algum momento se interligarem ou uma desencadear a outra. O modelo e as vias que regem o branqueamento é muito complexo e ainda carece de muita informação e estudos que trabalhem com essas vias em paralelos. Nas figuras 11 e 12 podemos ver como compreendemos os resultados desse trabalho, e como cada engrenagem pode se encaixar e funcionar para ocasionar a quebra da simbiose entre cnidário e alga simbiote, acarretando em branqueamento. Todas essas informações geradas e as que serão geradas no futuro, contribuem para o modelo de branqueamento em cnidários. Podendo as informações ajudarem na compressão de muitas questões ecológicas envolvidas no branqueamento.

Bibliografia

- Agusti, N-cabello Marco, R E Z Laura, As-salinas Juan Sebastia, Rovelo Oscar, and Lezama-cervantes Carlos. 2006. “Correlation of Chlorophyll a and Total Carotenoid Concentrations with Coral Bleaching from Locations on the Pacific Coast of Mexico” 39 (December): 279–91. doi:10.1080/10236240600976580.
- Boyle, R T, and M Lieberman. 1999. “Permeabilization by Streptolysin-O Reveals a Role for Calcium-Dependent Protein Kinase c Isoforms Alpha and Beta in the Response of Cultured Cardiomyocytes to Hyposmotic Challenge.” *Cell Biology International* 23 (10): 685–93. doi:10.1006/cbir.1999.0435.
- DAVID J. SMITH, DAVID J. SUGGETT AND NEILR. BAKER. 2005. “Is Photoinhibition of Zooxanthellae Photosynthesis the Primary Cause of Thermal Bleaching in Corals?” *Global Change Biology* 11: 1–11. doi:10.1111/j.1365-2486.2004.00895.x.
- Douglas, A E. 2003. “Coral Bleaching — How and Why?” 46: 385–92. doi:10.1016/S0025-326X(03)00037-7.

- Douglas, a E. 2003. "Coral Bleaching--How and Why?" *Marine Pollution Bulletin* 46 (4): 385–92. doi:10.1016/S0025-326X(03)00037-7.
- Downs, C a, John E Fauth, John C Halas, Phillip Dustan, John Bemiss, and Cheryl M Woodley. 2002. "Oxidative Stress and Seasonal Coral Bleaching." *Free Radical Biology & Medicine* 33 (4): 533–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160935>.
- Dunn, Simon R, Christine E Schnitzler, and Virginia M Weis. 2007. "Apoptosis and Autophagy as Mechanisms of Dinoflagellate Symbiont Release during Cnidarian Bleaching: Every Which Way You Lose." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 274 (1629): 3079–85. doi:10.1098/rspb.2007.0711.
- Gates, Ruth D., Garen Baghdasarian, and Leonard Muscatine. 1992. "Temperature Stress Causes Host Cell Detachment in Symbiotic Cnidarians: Implications for Coral Bleaching." *Biological Bulletin* 182 (3): 324. <http://www.jstor.org/stable/1542252?origin=crossref>.
- Ghiold, J. & Smith, S.H. 1990. Bleaching and recovery of deep-water, reef-dwelling invertebrates in the Cayman Islands, Bwi. *Caribbean Journal Science*, 26: 52-61.
- Goreau, T.J. & Macfarlane, A.H. 1990. Reduced growth rate of *Montastrea annularis* following the 1987-1988 coral bleaching event. *Coral Reefs*. 8: 211-215.
- Greene, N.E. and J.H. Shaw, The identification of atmospheric nitric oxide by a spectroscopic scan. *J. Air Pollut. Control Assoc.*, 1972. 22(6): 468–470.
- Hawkins, Thomas D, Benjamin J Bradley, and Simon K Davy. 2013a. "Nitric Oxide Mediates Coral Bleaching through an Apoptotic-like Cell Death Pathway: Evidence from a Model Sea Anemone-Dinoflagellate Symbiosis," 1–9. doi:10.1096/fj.13-235051.
- . 2013b. "Nitric Oxide Mediates Coral Bleaching through an Apoptotic-like Cell Death Pathway: Evidence from a Model Sea Anemone-Dinoflagellate Symbiosis." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (12): 4790–98. doi:10.1096/fj.13-235051.
- Hawkins, Thomas D, and Simon K Davy. 2013a. "SHORT COMMUNICATION Nitric Oxide and Coral Bleaching: Is Peroxynitrite Generation Required for Symbiosis Collapse?" 4: 3185–88. doi:10.1242/jeb.087510.
- . 2013b. "Nitric Oxide and Coral Bleaching: Is Peroxynitrite Generation Required for Symbiosis Collapse?" *The Journal of Experimental Biology* 216 (Pt 17): 3185–88. doi:10.1242/jeb.087510.
- Hermansen, Tyge Dahl, Michael Arvedlund, and G Curt Fiedler. 2005. "Calcium Antagonists Inhibit the Discharge of Cnidaria in Response to Electrical Stimulation in the Giant Tropical Sea Anemone *Heteractis crispa* Ehrenberger (Anthozoa)" 38 (December): 269–74. doi:10.1080/10236240500479768.

Hoegh-Guldberg, O. & Smith, G.J. 1989. Light, salinity, and temperature and the population density, metabolism and expor of zooxanthellae from *Stylophora pistillata* and *Seriatopora hystrix*. *Journal Exploration Marine Biology Ecology*. 129: 279-303.

Ignarro, L.J., et al., Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1981. 218(3): 739–749.

Ignarro, L.J., et al., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987. 84(24): 9265–9269.

Jokiel, P.L. & Coles, S.L. 1990. Response of Hawaiian and other Indo Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs*. 8: 155-162.

Klein, B Y Michael G, Bruce J Simon, and Martin F Schneider. 1992. "EFFECTS OF PROCAINE AND CAFFEINE ON CALCIUM RELEASE MUSCLE," 341–66.

Kleppel, G.S.; Dodge, R.E.; Reese, C.J. 1989. Changes in pigmentation associated with the bleaching of stony corals. *Limnology Oceanographic*. 34: 1331-1335.

Koesling, D., Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods*, 1999. 19(4): 485–493.

Liñán-Cabello, Marco a, Laura a Flores-Ramírez, José Francisco Cobo-Díaz, Tania Zenteno-Savin, Norma O Olguín-Monroy, Aramis Olivos-Ortiz, and Adrián Tintos-Gómez. 2010. "Response to Short Term Ultraviolet Stress in the Reef-Building Coral *Pocillopora Capitata* (Anthozoa: Scleractinia)." *Revista de Biología Tropical* 58 (1): 103–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20411710>.

Marco Agustín, Liñán-Cabello, Flores-Ramírez Laura, Zacarías-Salinas Juan Sebastián, Hernández-Rovelo Oscar, and Lezama-Cervantes Carlos. 2006. "Correlation of Chlorophyll a and Total Carotenoid Concentrations with Coral Bleaching from Locations on the Pacific Coast of Mexico." *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 39 (4): 279–91. doi:10.1080/10236240600976580.

Martin, E., et al., A constitutively activated mutant of human soluble guanylyl cyclase (sGC): implication for the mechanism of sGC activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003. 100(16): 9208–9213.

Murad, F., et al., Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1979. 11: 175–204.

Murad, F., Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J. Clin. Invest.*, 1986. 78(1): 1–5.

Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987. 327(6122): 524–526.

Perez, Santiago, and Virginia Weis. 2006. "Nitric Oxide and Cnidarian Bleaching : An Eviction Notice Mediates Breakdown of a Symbiosis" 4: 2804–10. doi:10.1242/jeb.02309.

Porter, J.W.; Fitt, W.K.; Spero, H.J.; Rogers, C.S.; White, M.W. 1989. Bleaching in reef corals: physiological and stable isotopic responses. *National Acad Sci USA* 86: 9342–9346.

Sandeman, I M. 2006. "Fragmentation of the Gastrodermis and Detachment of Zooxanthellae in Symbiotic Cnidarians : A Role for Hydrogen Peroxide and Ca²⁺ in Coral Bleaching and Algal Density Control" 54 (December): 79–96.

Sawyer, S J, and L Muscatine. 2001. "Cellular Mechanisms Underlying Temperature-Induced Bleaching in the Tropical Sea Anemone *Aiptasia Pulchella*." *The Journal of Experimental Biology* 204 (Pt 20): 3443–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707495>.

Sawyer, Sara J, and Leonard Muscatine. 2001. "Cellular Mechanisms Underlying Temperature-Induced Bleaching in the Tropical Sea Anemone *Aiptasia Pulchella*" 3456: 3443–56.

Stone, J.R. and M.A. Marletta, Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 1994. 33(18): 5636–5640.

Santiago Lamas and Enrique Cadenas. Nitric Oxide, Cell Signaling, and Gene Expression. 2006 by Taylor & Francis Group, LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group.

Szmant, A.M. & Gassman, N.J. 1990. The effects of prolonged "bleaching" on the tissue biomass and reproduction of the coral *Montastra annularis*. *Coral Reef*, 8: 217–224.

Weis, Virginia M. 2008a. "Commentary Cellular Mechanisms of Cnidarian Bleaching : Stress Causes the Collapse of Symbiosis" 4: 3059–66. doi:10.1242/jeb.009597.

———. 2008b. "Cellular Mechanisms of Cnidarian Bleaching: Stress Causes the Collapse of Symbiosis." *The Journal of Experimental Biology* 211 (Pt 19): 3059–66. doi:10.1242/jeb.009597.

Wink, D.A. and J.B. Mitchell, Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998. 25(4-5): 434–456.

Wink, D.A., K.M. Miranda, and M.G. Espey, Cytotoxicity related to oxidative and nitrosative stress by nitric oxide. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 2001. 226(7): 621–623.

Zamoum, Thamilla, and Paola Furla. 2012. "Symbiodinium Isolation by NaOH Treatment." *The Journal of Experimental Biology* 215 (Pt 22): 3875–80. doi:10.1242/jeb.074955.