

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**ESTRESSE OXIDATIVO NO HIDROCORAL *Millepora alcicornis* EXPOSTO À
ACIDIFICAÇÃO DA ÁGUA DO MAR**

DÉBORA CAMACHO LUZ

Orientador: Prof. Dr. Adalto Bianchini

Rio Grande, Setembro 2016

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha família. Minha mãe Denise e minha irmã Nathalia, pela força que possuem e me transferem. Por todos os momentos que precisei e nunca me faltaram, pelo apoio, dedicação e amor que me dedicaram sempre.

A minha avó, que carinhosamente me recebeu na sua casa e dedicou todos os dias a me cuidar e me amparar. Por todas as vezes que me fez sorrir, e pelo ombro amigo sempre disposto a me receber com uma palavra de amor e sabedoria.

A minha madrinha Paula, que foi colocada na minha vida por um anjo. Agradeço pelo carinho, pela amizade e por todo apoio que me dedica.

Ao meu orientador, agradeço pela confiança, pela paciência e pelo conhecimento. Sobretudo agradeço pelo exemplo de profissional e ser humano, que me inspira a seguir em frente na minha vida profissional.

Ao meu colega e querido amigo Yuri Zebral, pela ajuda fundamental na realização deste trabalho, pelas caronas e bom gosto musical, momentos de descontração, e pelos “puxões de orelha” em forma de conselho. Obrigado!

A todos os membros do grupo de pesquisa. Sobretudo a Joseane, Roberta e a Laura que ajudaram na realização deste trabalho. A todos sou grata pelas trocas de experiência e conhecimento.

Aos queridos amigos que fiz durante essa jornada, em especial ao meu amigo Magno, pelos abraços rápidos no corredor, mas sempre cheios de carinho. E aos amigos da sala 1. Juliana, Silvana, Amanda, Vivi, Nicole, Fernandas, Juliano, Yuri, Marcelo Estrela, Mari, e todos os outros que alegraram meus dias e os tornaram mais leves. Sempre com boas risadas, conselhos e ensinamentos.

Aos meus tios e primos. As “tias” de coração Adiene e Eloisa, pelo carinho, conselhos e apoio. Ao meu padrasto Ricardo. Obrigada!

As minhas amigas de longa data, que assim como eu percorrem esse caminho e assim puderam entender minhas ausências, ouvir meus choros e me apoiarem sempre.

Roberta, Sussu e Isa, obrigada!

Aos amigos Lúcia e Christian, meu agradecimento pelo apoio que me deram. Ao Christian, por ter enxergado minha necessidade e ter me dado todo apoio para seguir adiante.

Aos professores do PPGCF pelos ensinamentos. Ao professor Luiz Eduardo (Carioca) pelos conselhos que me encorajaram.

Aos técnicos dos laboratórios do ICB, sobretudo a Thais e ao Josencler, que estiverem sempre disponíveis para me auxiliar durante a execução das análises.

Aos funcionários do ICB, secretários, porteiros e a dona Maria, que alegra a todos com seu bom dia, cafezinhos e conversas.

A equipe da rede de pesquisa Coral Vivo, pela dedicação que permitiu a execução deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a banca avaliadora, Carlos Eduardo da Rosa do PPG-CF FURG e Emiliano Nicolas Calderón da UFRJ, por suas contribuições para a melhora deste trabalho.



“A única coisa que importa é colocar em prática, com sinceridade e seriedade, aquilo em que se acredita.”

Dalai Lama

Sumário

Resumo Geral	5
Introdução Geral	6
Recifes de corais	6
Filo Cnidaria: corais e hidrocorais.....	9
Hidrocorais: Gênero <i>Millepora</i>	11
Mudanças Climáticas.....	12
Acidificação dos Oceanos	13
Efeitos fisiológicos da acidificação marinha	15
As espécies reativas (ER)	18
Sistema antioxidante.....	20
Estresse oxidativo	Erro! Indicador não definido.
Objetivo Geral	24
Objetivos Específicos	24
Manuscrito	25
Abstract.....	27
1. Introduction	28
2. Materials and methods.....	31
3. Results	35
4. Discussion.....	35
Acknowledgements	39
References	39
Figure Legends	45
Figures	47
Conclusões Gerais	52
Bibliografia Geral.....	53

Resumo Geral

Os recifes de corais encontram-se seriamente ameaçados em função de impactos ambientais locais e globais. A acidificação dos oceanos, devido ao aumento global na emissão de CO₂, é uma das alterações que mais ameaçam os recifes de corais. A redução do pH marinho e o aumento na pCO₂ pode alterar diversas funções fisiológicas em organismos marinhos, incluindo um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e alterações no sistema de defesa antioxidante. Portanto, o presente estudo avaliou as respostas de parâmetros relativos ao estresse oxidativo [capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP), concentração total de glutathiona (GSHt), razão entre as concentrações de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG), níveis de peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PC)] no coral de fogo *Millepora alcicornis* exposto a diferentes níveis de pH da água do mar (8,1; 7,8; 7,5 e 7,2) por 16 e 30 dias. Após exposição de 16 dias, a ACAP aumentou nos hidrocorais expostos aos níveis leve (pH 7,8) e intermediário (pH 7,5) de acidificação da água do mar. Após 30 dias de exposição, a PC foi dependente do nível de acidificação da água do mar, sendo significativamente maior nos hidrocorais expostos aos níveis intermediário (pH 7,5) e severo (pH 7,2) de acidificação da água do mar. Estes resultados indicam que o sistema de defesa antioxidante do hidrocoral *M. alcicornis* é capaz de responder após a exposição por curto período de tempo (16 dias) a níveis leve (pH 7,8) e intermediário (pH 7,5) de acidificação da água do mar. Adicionalmente, indicam que o sistema de defesa antioxidante deste hidrocoral não consegue compensar o aumento de espécies reativas de oxigênio após exposição a níveis intermediário (pH 7,5) e severo (pH 7,2) de acidificação da água do mar por um período maior de tempo (30 dias), apresentando danos oxidativos significativos em proteínas, o que pode comprometer a saúde deste hidrocoral.

Introdução Geral

Recifes de corais

Os recifes de corais são grandes estruturas rochosas, formadas pelo aglomerado de organismos, vegetais ou animais, capazes de precipitar carbonato de cálcio para a formação de uma estrutura de sustentação. Essas estruturas são rígidas e resistentes ao efeito das correntes oceânicas, formando um dos ecossistemas mais ricos e diversos do planeta (Bellwood et al., 2004; Hetzel et al., 1994). O nome recife de “coral” é dado devido à grande importância que os corais, sobretudo aqueles pertencentes à ordem Scleractinia, possuem na formação destes ambientes. No entanto, em muitos recifes, outros organismos podem exercer uma importância tão grande ou até maior na formação destas estruturas, como por exemplo, as algas calcárias e os hidrocorais (Castro e Zilberbeg, 2016; Knowlton et al., 2010).

Devido ao alto grau de complexidade, os recifes de corais formam uma grande teia alimentar e servem de abrigo e proteção para diversas espécies da fauna e flora marinhas (Knowlton et al., 2010). Os recifes de corais são considerados o ecossistema marinho mais produtivo, sendo muitas vezes comparados com as florestas tropicais, ambientes mais produtivos do planeta (Odum e Odum, 1955). Para os seres humanos, os recifes de corais são de suma importância, pois protegem regiões costeiras de grandes erosões, além de servirem como importante fonte de renda para comunidades locais. Estima-se que cerca de 500 milhões de pessoas dependem direta ou indiretamente desse ecossistema para a sua subsistência, uma vez que os ambientes coralinos possuem uma beleza ímpar e funcionam como grandes criadouros de peixes e outros organismos com valor comercial. Ainda, nos últimos anos, os organismos recifais estão sendo estudados pelas indústrias farmacêutica e cosmética. Ao se adaptarem a um ambiente de alta competição por espaço e grande nível de predação, estes organismos desenvolveram,

como mecanismo de proteção, a secreção de substâncias quimicamente ativas, as quais vêm se mostrando promissoras no tratamento de doenças humanas (Moberg e Folke, 1999; Wilkinson, 2008).

Os recifes de corais estão associados a baixas profundidades, águas claras e oligotróficas. Acredita-se que a interação mutualística entre os corais e algas dinoflageladas simbiotes do gênero *Symbiodinium sp.*, permitiu a estes organismos evoluírem nestes ambientes pobres em nutrientes (Stat et al., 2008). As zooxantelas, como são conhecidas estas algas, são organismos fotossintetizantes que habitam vacúolos intracelulares na endoderme do coral. O simbiossoma, como são chamados estes espaços, são formados por membranas do endossimbionte e uma membrana mais externa derivada do coral hospedeiro (Davy et al., 2012; Marangoni et al., 2016). Estas algas são de grande importância para a formação dos recifes, pois fornecem ao hospedeiro carbono orgânico, principalmente na forma de glicerol, e oxigênio para a produção de energia. Acredita-se que até 95% do carbono fixado pelas algas pode ser repassado ao hospedeiro. No entanto, essa taxa depende de alguns fatores, como a necessidade de cada espécie ou indivíduo pelos fotossintatos (Muscatine e Porter, 1977). Em contrapartida, o coral fornece proteção às zooxantelas, bem como compostos como nitrogênio e dióxido de carbono (Lesser, 2004; Muscatine e Porter, 1977). Acredita-se que os corais hospedeiros exercem certo controle sobre seus simbiotes. Segundo Barrot *et al.* (2015), o coral pode promover a acidificação no interior do simbiossoma através da conversão de bicarbonato em dióxido de carbono, estimulando assim a fotossíntese. Além deste controle, evidências demonstram uma possível capacidade do coral em controlar a população do simbiote através da restrição de nutrientes (Barott et al., 2015; Davy et al., 2012).

A relação entre os corais e seu ambiente, conforme descrito no parágrafo anterior, restringiu a distribuição deste ecossistema em regiões tropicais rasas dos oceanos Indo-pacífico e Atlântico (Fig. 1). As diferenças geológicas e biológicas de cada área de abrangência dão aos recifes características únicas. Os corais do Indo-pacífico e do Caribe são considerados os mais diversos, pois possuem uma grande quantidade de espécies de corais escleractíneos. Por sua vez, o Brasil abriga os únicos recifes coralíneos do Atlântico Sul, os quais se encontram distribuídos ao longo da costa brasileira, desde o Parcel de Manuel Luiz no Maranhão até os recifes de Viçosa no sul da Bahia. Estes também podem ser encontrados em ilhas oceânicas, como Fernando de Noronha em Pernambuco (Hetzl *et al.*, 1994; Ferreira & Maida, 2006). A história, morfologia e biota dos recifes brasileiros proporcionam a estes características únicas, diferenciando-os de recifes de outras regiões. Entre as características mais marcantes dos recifes brasileiros estão o alto grau de endemismo, pouca diversidade e baixa complexidade. Ainda, estes ambientes ocorrem em águas com alto grau de turbidez, quando comparado com recifes de outras regiões (Castro e Zilberbeg, 2016; Leão *et al.*, 2003). No entanto, a distribuição dos recifes de corais no Brasil é descontínua e não homogênea, conferindo particularidades entre os recifes brasileiros. O maior complexo recifal do Brasil encontra-se no sul da Bahia. Nele é possível encontrar representantes de todas as espécies que compõem os diferentes recifes brasileiros, além de espécies que são restritas a este local (Hetzl *et al.*, 1994).

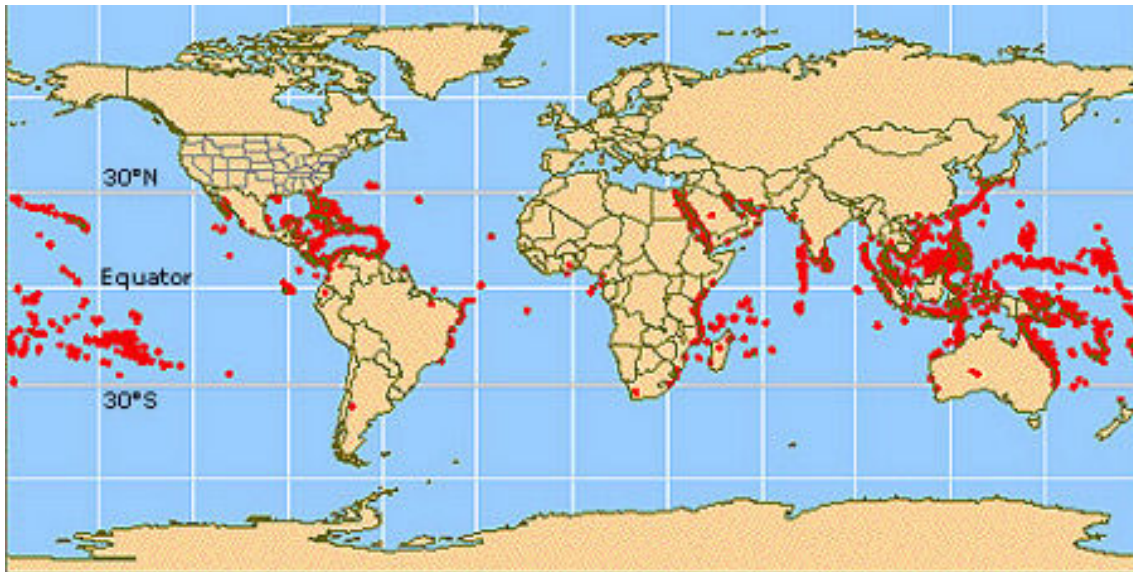


Figura 1. Distribuição mundial dos recifes de corais, representados por pontos vermelhos. Nota-se que a maior parte dos recifes está localizada entre as latitudes 30° norte e 30° sul. Imagem do site da National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA - http://www.coris.noaa.gov/about/what_are/)

Filo Cnidaria: corais e hidrocorais

Os corais são organismos exclusivamente marinhos, dotados de esqueleto calcário ou córneo, pertencentes ao filo Cnidaria. Os cnidários possuem as seguintes características comuns: cavidade gastrointestinal revestida com endoderme chamada de cavidade gastrovascular, ausência de ânus, boca circundada por tentáculos e parede corporal constituída por três camadas (epiderme, endoderme e mesogléia). A presença de cnidas (do grego "knide", que significa urtiga), estruturas que dão nome ao filo, destaca-se por ser uma característica única do grupo. Estes organismos podem apresentar-se de duas diferentes formas. Os pólipos são formas sésseis ou de movimento restrito, tendo o corpo em forma de tubo com a face boral voltada para cima e a face oposta ou aboral voltada para baixo. Por sua vez, as medusas, são organismos livre natantes, em forma de sino e com boca abrindo-se para baixo (Ruppert et al., 2005).

O filo Cnidaria é dividido nas classes Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa, Anthozoa e Staurozoa, sendo que os corais estão presentes apenas na classe Anthozoa,

representada pelos corais pétreos e corais negros, também chamados de corais escleractíneos ou verdadeiros, e os octocorais (Ruppert et al., 2005). Apesar de possuírem características bastante semelhantes aos corais verdadeiros, os hidrocorais da classe Hydrozoa não são considerados corais verdadeiros e são comumente chamados de hidroides calcificadores. No entanto, por razões práticas e didáticas, os hidrocorais são genericamente chamados de corais (Castro e Zilberbeg, 2016). Segundo Lewins (2006), os corais escleractíneos e os hidrocorais apresentam semelhanças fisiológicas, incluindo a importante relação entre o hospedeiro e os endossimbiontes. No entanto, algumas diferenças quanto à estrutura dos pólipos, ciclo de vida e a organização do esqueleto são visíveis entre estes grupos. Nos antozoários, é possível encontrar uma faringe entre a boca e cavidade gastrovascular, enquanto nos hidrozoários, esta estrutura é ausente. Quanto ao esqueleto, os corais escleractíneos secretam seu esqueleto externamente pela precipitação de carbonato de cálcio na forma de aragonita, a partir da base do pólipo. Por sua vez, os hidrocorais também precipitam o carbonato de cálcio na forma de aragonita. No entanto, a deposição se dá internamente. Além disso, apresentam dois tipos de poros simples em seu esqueleto, chamados dactilíporo e gastróporo, que abrigam diferentes tipos de pólipos (Fig. 2B). Os dactilozóides contidos nos dactilíporos são os zooides responsáveis pela reprodução dos hidrocorais, enquanto nos gastróporos, os gastrozóides são responsáveis pela alimentação e defesa da colônia. Uma das diferenças mais marcantes está no ciclo de vida. Enquanto os antozoários são organismos exclusivamente polipóides, os hidrocorais são considerados meduzoários, uma vez que podem apresentar as formas de pólipo e medusa no seu ciclo de vida (Lewis, 2006; Ruppert et al., 2005). (Fig. 2A).

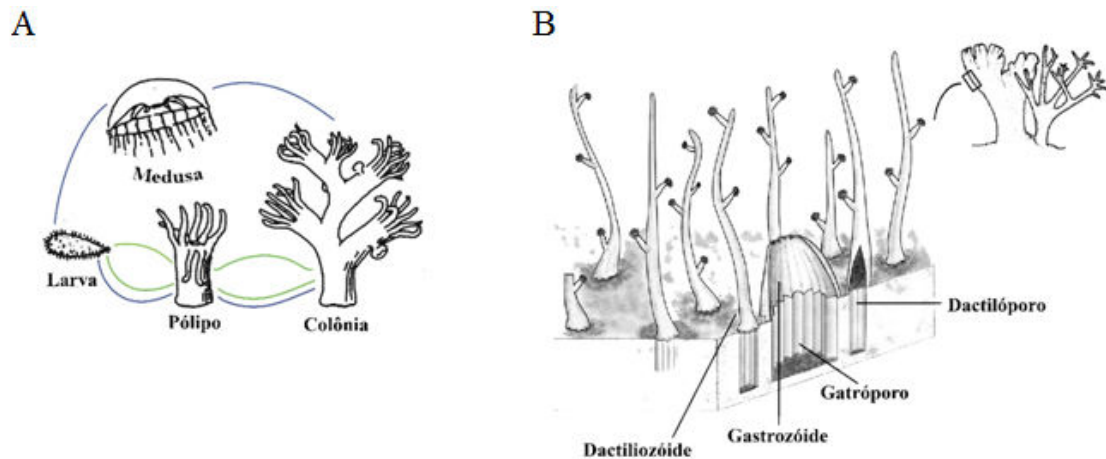


Figura 2. (A) Ciclo de vida de um antozoário (traços verdes) e de um hidrozoário (traço azul). (B) Poros no esqueleto de um hidrozoário. Dactilíporos são poros menores e abrigam os dactilozóides. Gastropóros são poros maiores e abrigam os gastrozóides. Imagem adaptada de Reis e Santodomingos (2002).

Hidrocorais: Gênero *Millepora*

No âmbito do presente estudo, destacam-se os hidrocorais, especialmente aqueles do gênero *Millepora* Linnaeus 1758. Dentre os formadores de recife no Brasil, os hidrocorais do gênero *Millepora* destacam-se por sua abundância e distribuição (Amaral et al., 2008). Das dezessete espécies conhecidas do gênero, quatro são encontradas na costa brasileira. Destas, *M. braziliensis* Verrill, 1868, *M. nitida* Verrill, 1868 e *M. laboreli* Amaral et al., 2008 são endêmicas, enquanto *M. alcicornis* Linnaeus 1758 é cosmopolita (Amaral et al., 2008). O hidrocoral *M. alcicornis* (Fig. 3) é conhecido por sua abundância e ampla distribuição nos recifes de corais do Brasil (Amaral et al., 2008). Seu crescimento se dá predominantemente através da formação de ramificações, o que lhe confere maior complexidade comparada aos corais com crescimento incrustante e massivo. Esta característica permite *M. alcicornis* abrigar uma grande diversidade de outros organismos da micro e da macrofauna marinha (Leal et al., 2015). Apesar da grande importância ecológica para os recifes de corais brasileiros, ainda há poucos estudos sobre o comportamento das espécies do gênero *Millepora* frente às mudanças ambientais previstas.



Figura 3. Hidrocoral *Millepora alcicornis*. Fonte: Rede de Pesquisa Coral Vivo (<https://www.facebook.com/Coralvivo/photos/a.356496697714453.88478.192082700822521/1122882267742555/?type=3&theater>). Fotografia: Athila Bertoncini.

Mudanças Climáticas

Apesar da grande riqueza e importância dos recifes de corais, estes ecossistemas encontram-se dentre os mais impactados por ações antrópicas, sendo considerado um dos mais vulneráveis às atividades humanas (Halpern et al., 2007; Wilkinson, 2008). Segundo a organização *Global Coral Reef Monitoring Network* (2008), aproximadamente 19% dos recifes no mundo está degradado irreversivelmente (Wilkinson, 2008). Neste contexto, as mudanças climáticas ameaçam seriamente a integridade dos recifes de corais. Vários estudos apontam o aumento da temperatura e a contaminação química como os principais causadores de estresse em corais, relacionando-os a eventos de branqueamento (Loya & Rinkevich, 1980; Jokiel & Coles, 1990; Gates *et al.*, 1992; Fitt & Warner, 1995; Brown, 1997; Hoegh-Guldberg, 1999; Hughes, 2003; Downs *et al.*, 2005; Fabricius *et al.*, 2005; Anthony *et al.*, 2007; Leão *et al.*, 2008; Wilkinson, 2008; van Dam *et al.*, 2011; Marangoni, 2014; Marques, 2014; Barott *et al.*, 2015). Este fenômeno é caracterizado pela expulsão ou degradação das algas simbiotes. Acredita-se que esta resposta está ligada ao aumento de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERO/ERN). A relação entre a produção de

ERO/ERN, tanto no coral quanto na zooxantela, e a expulsão das algas, já estão bem descritos para os estressores supracitados (Downs et al., 2002).

Segundo o *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), as atuais mudanças climáticas estão claramente relacionadas a ações antrópicas, principalmente no que se refere ao aumento nas emissões de gases, chamados gases do efeito estufa [dióxido de carbono (CO_2), gás metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O)] (Field et al., 2014). Desde a fase pré-industrial, as emissões de fontes antrópicas destes gases na atmosfera vêm batendo recordes. Em 2015, houve um aumento de 3,05 ppm de CO_2 na atmosfera, sendo este o maior aumento desde 1959 (NOAA, 2015). Dentre as principais alterações ambientais relacionadas às atividades humanas, a acidificação da superfície dos oceanos é vista com grande preocupação pela comunidade científica. Desde o início da Revolução Industrial (Século XVIII), o pH da superfície dos oceanos reduziu em ~0,1 unidade, o que corresponde a um decréscimo de ~28% do pH marinho (Cao and Caldeira, 2008). Dados publicados no último relatório do IPCC, estimam que, no cenário mais pessimista, a redução do pH pode chegar a 0,3-0,4 unidades nos próximos 100 anos, caso a emissão de gases de origem antrópica continue aumentando (Field et al., 2014).

Acidificação dos Oceanos

O oceano é responsável por absorver cerca de 30% do CO_2 emitido. O CO_2 absorvido interfere diretamente sobre o sistema de carbono inorgânico dissolvido (CID), o qual é importante para o equilíbrio químico da água do mar (Hennige et al., 2014). Ao entrar em contato com a água, o CO_2 reage para formar ácido carbônico (H_2CO_3). Por sua vez, este se dissocia rapidamente no íon bicarbonato (HCO_3^-), com a liberação de um próton (H^+). A dissociação do HCO_3^- dá origem ao íon carbonato (CO_3^{2-}) através de

uma reação que libera um H^+ no ambiente (Gattuso and Hansson, 2011) (Fig. 4). Com o aumento da absorção de CO_2 , essa relação fica desbalanceada. O aumento de ácido carbônico (H_2CO_3) na água leva a um rápido aumento nos níveis de bicarbonato e prótons, que em excesso reagem com os íons CO_3^{2-} , formando novamente HCO_3^- ($CO_2 + H_2O + CO_3^{2-} \rightarrow 2HCO_3^-$). Portanto, essa é uma forma eficiente de tamponamento dos íons H^+ . Por sua vez, o aumento de H_2CO_3 provoca a redução do pH da água, aumentando assim a concentração de HCO_3^- e reduzindo a concentração de CO_3^{2-} (Gattuso and Hansson, 2011).

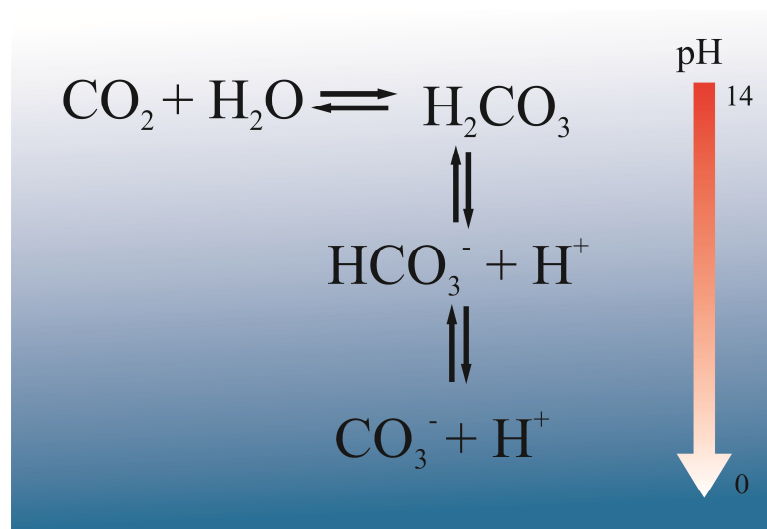


Figura 4. Reação do carbono inorgânico com a água para a formação de ácido carbônico, seguido da dissociação do ácido carbônico em bicarbonato e do bicarbonato em carbonato, com a liberação de prótons no ambiente e a alteração do gradiente de pH.

Com base no exposto acima, os dados sobre a emissão de CO_2 na atmosfera são bastante alarmantes, uma vez que a mesma pode levar à redução do pH dos oceanos. Por sua vez, o desequilíbrio químico gerado deve afetar a grande diversidade de animais marinhos, especialmente aqueles que secretam seu esqueleto a partir do carbonato de cálcio. De fato, a necessidade de tamponamento de prótons reduz a disponibilidade de CO_3^{2-} e conseqüentemente aumenta a dissolução do esqueleto destes organismos (Cao and Caldeira, 2008). Muitas pesquisas mostram os efeitos da redução do pH sobre o

esqueleto e o processo de calcificação (Allemand et al., 2011; Cohen et al., 2009; Fabry et al., 2008). O estudo deste efeito é de grande importância. Porém, cabe ressaltar que o aumento de CO₂ dissolvido na água do mar pode também afetar outros mecanismos fisiológicos, além do processo de calcificação (Kaniewska et al., 2012). No entanto, os estudos sobre os efeitos do pH sobre estes mecanismos ainda são bastante reduzidos em corais. Portanto, é necessário e urgente que estudos sejam realizados visando à compreensão das possíveis alterações fisiológicas da acidificação marinha, além daquelas associadas ao processo de calcificação.

Efeitos fisiológicos da acidificação marinha

Assim como descrito para a água do mar, o CO₂ reage com os fluídos corporais e se dissocia em HCO₃⁻ e H⁺. Portanto, essa reação é essencial à vida, pois estes compostos estão envolvidos em diversas funções fisiológicas. A maioria dos organismos é capaz de regular esse processo, mantendo o equilíbrio ácido-base nos meios internos. Essa regulação é muitas vezes essencial, seja para a manutenção do bom funcionamento do metabolismo celular ou mesmo para funções como a calcificação (Boron, 2004). No entanto, os mecanismos atualmente conhecidos para a regulação do equilíbrio ácido-base em organismos aquáticos não se diferenciam daqueles desenvolvidos por organismos ancestrais para lidar com o aumento na concentração de CO₂ na atmosfera. Basicamente, esses mecanismos são representados pela ativação do fluxo de prótons pela célula (Fig. 5), aumento de bicarbonato e outros tampões não bicarbonato para o tamponamento de prótons, hiperventilação, depressão do metabolismo energético com consequente redução na produção de CO₂, entre outros (Pörtner et al., 2004). Porém, o gasto energético para manter a homeostasia do sistema ácido-base é relativamente grande. Portanto, pequenos aumentos nas concentrações de

CO₂ no meio interno podem causar estresse aos organismos e, conseqüentemente, disfunções fisiológicas.

Diversos danos fisiológicos estão associados ao desequilíbrio do sistema ácido-base. Por exemplo, a redução do pH no sítio de calcificação reduz a disponibilidade do CaCO₃, diminuindo assim a taxa de calcificação em animais calcificadores. Além disso, a acidificação celular tem influência sobre a produção de energia (Kleypas et al., 2005). Como mencionado acima, a redução do metabolismo energético é um dos mecanismos pelos quais os organismos tentam compensar a redução do pH. A redução de energia, tanto pela redução do metabolismo energético quanto pelo desvio dos recursos energéticos para manter o equilíbrio ácido-base, também tem consequência negativa sobre o processo de calcificação, uma vez que este processo é energeticamente caro para o organismo (Fabry et al., 2008). A redução na disponibilidade energética também pode trazer outras consequências ao equilíbrio homeostático dos organismos, como por exemplo, redução da biossíntese, alteração na expressão gênica, desequilíbrio do sistema antioxidante, alteração do sistema imune, entre outras (Hennige et al., 2014). Em organismos aquáticos, a manutenção do equilíbrio ácido-base pode ser ainda mais custosa, tendo em vista o padrão ventilatório destes animais. Além disso, cabe salientar que o transporte de íons é o principal mecanismo envolvido na regulação do pH em animais marinhos. A regulação ácido-base torna o meio intracelular mais protegido contra alterações do que o meio extracelular, o qual fica mais susceptível a danos. A acidificação do meio extracelular pode alterar várias funções fisiológicas, tais como reprodução, crescimento e estabilidade celular (Pörtner et al., 2004; Reipschläger and Pörtner, 1996).

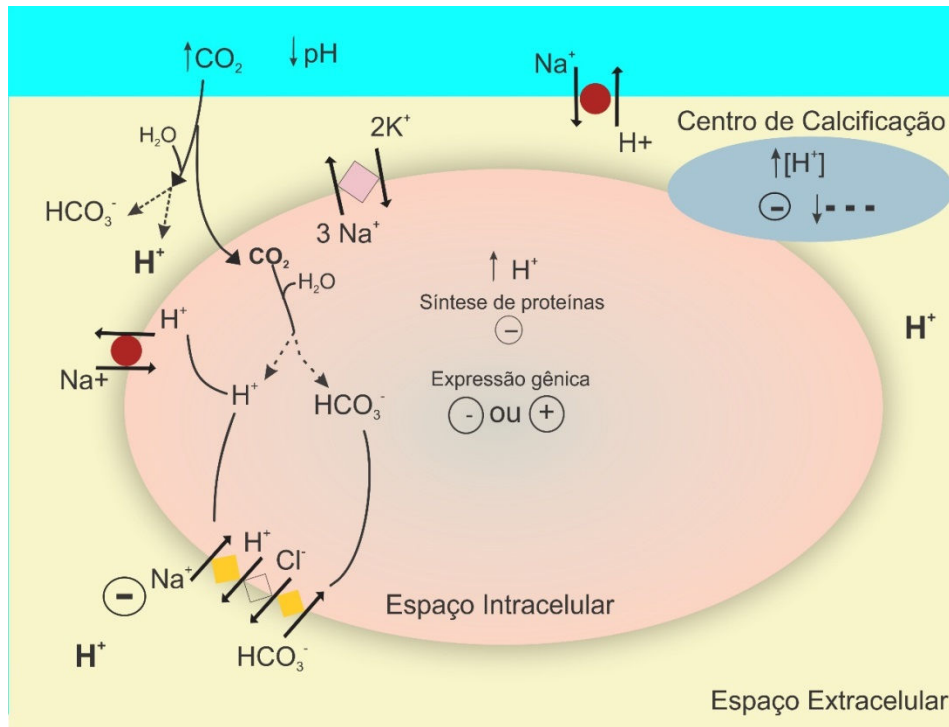


Figura 5. Modelo ilustrativo do fluxo de prótons entre o meio externo e o meio interno de animais marinhos. Efeito do aumento de prótons no sítio de calcificação. O aumento intracelular de prótons provoca redução (-) da síntese proteica e pode diminuir (-) ou aumentar (+) a expressão gênica. Imagem modificada a partir de Pörtner (2008).

A alta demanda energética para a manutenção homeostática torna os invertebrados marinhos especialmente vulneráveis ao desequilíbrio ácido-base. Estes organismos possuem desempenho hipometabólico e baixa capacidade de compensar alterações nos padrões iônicos (Fabry et al., 2008). Apesar disso, os efeitos da acidificação marinha sobre estes organismos começaram a receber maior atenção apenas na última década. Ainda assim, a maior parte dos estudos atualmente disponíveis investigaram os efeitos da redução do pH sobre a formação e manutenção do esqueleto calcário de animais calcificadores (Kaniewska et al., 2012). No entanto, o desequilíbrio energético gerado pela acidificação, bem como o aumento na concentração de prótons nos meios extra e intracelular podem afetar outros parâmetros fisiológicos importantes. Por exemplo, a acidificação celular possui grande influência sobre o funcionamento mitocondrial. Foi demonstrado que a redução em 0,7 unidades no pH aumenta a

produção mitocondrial de ERO em bivalves (Haider et al., 2016). Neste contexto, é importante lembrar que o processo de fosforilação oxidativa se dá basicamente pelo efluxo de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas através dos complexos I, II, III e IV, gerando neste espaço um gradiente eletroquímico necessário para o funcionamento da ATP-sintase (complexo V) (Martinez-Cruz et al., 2012) (Fig. 6). O acúmulo de prótons intracelulares pode influenciar o potencial elétrico da membrana mitocondrial, uma vez que a membrana externa da mitocôndria é bastante permeável a estes íons. Esse aumento, por sua vez, provoca um acúmulo de prótons na matriz mitocondrial e no espaço intracelular, que gera um aumento dos elétrons nos complexos da cadeia respiratória, inibindo a síntese de ATP e aumentando a produção de ERO.

As espécies reativas (ER)

As ERO são naturalmente produzidas por todos os organismos aeróbicos, seja durante a fase final da respiração celular ou durante o processo de fotossíntese, quando o oxigênio (O_2) é reduzido à água (Abele et al., 2012; Hermes-Lima, 2004). Durante a respiração celular, as ERO são produzidas principalmente na mitocôndria, onde ocorre a fosforilação oxidativa (Fig. 6). Estima-se que aproximadamente 2% do oxigênio utilizado pela mitocôndria converta-se em ERO (Braidot et al., 1999; Starkov, 2008). Em organismos marinhos, a produção de ERO é alta devido a grande produção de ERO pelos oceanos. A produção de ERO nesses organismos está associada às respostas aos estressores ambientais, tais como as mudanças climáticas (Abele et al., 2012).

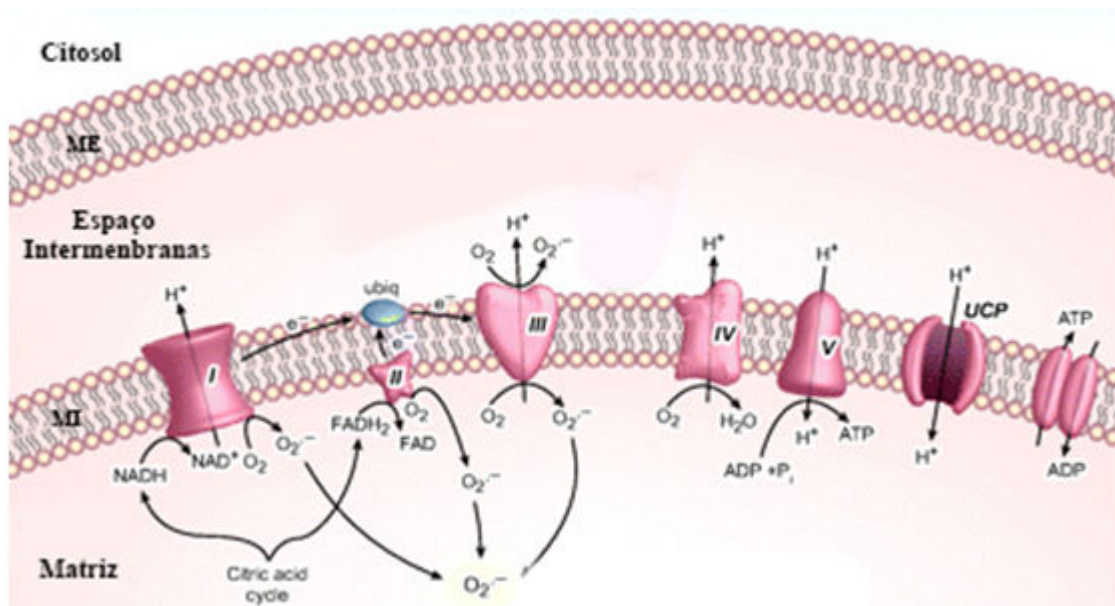


Figura 6. Geração de espécies reativas na mitocôndria pelo acúmulo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Adaptado do sítio na internet (<http://radlivres2010-1.blogspot.com.br/2010/07/especies-reativas-de-oxigenio-ocorrem.html>).

O elemento oxigênio (O) é um birradical, ou seja, apresenta em sua face externa um par de elétrons desemparelhados sendo, portanto, facilmente reduzido. A primeira redução do O_2 leva à formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que por sua vez dá origem à maior parte das outras ERO. A formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), outra importante ERO, se dá pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, que pode ocorrer espontaneamente ou através da atividade da superóxido dismutase (SOD). A partir da redução parcial do H_2O_2 , ocorre a formação de uma terceira ERO, o radical hidroxila ($\bullet OH$). Este radical também pode ser formado pela reação de Fenton, a qual é mediada por metais de transição (Borg, 1993; Halliwell and Gutteridge, 2007). Além de ERO, espécies radicalares derivadas de outros compostos, como o nitrogênio, podem ser formadas durante a atividade celular. Por exemplo, o óxido nítrico (NO^{\bullet}) ao reagir com o O_2 forma o peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) com alto poder redutor.

As ER, sobretudo H_2O_2 e NO^{\bullet} , desempenham importantes funções no organismo, como a sinalização celular. No entanto, apesar de possuírem importantes

funções fisiológicas, estas espécies precisam estar em níveis bastante controlados no organismo. Para controlar a produção e o acúmulo de ER, os organismos desenvolveram um conjunto de mecanismos conhecido como sistema antioxidante (Hermes-Lima, 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007).

Sistema antioxidante

Para lidar com a produção de ER, as células são providas de diferentes recursos de proteção antioxidante. O sistema antioxidante enzimático é formado por uma série de enzimas capazes de atuar contra as ERO/ERN, como a SOD, responsável pela decomposição do $O_2^{\cdot-}$, e a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx), que agem na decomposição do H_2O_2 (Fig. 7). Além das enzimas antioxidantes, alguns compostos podem atuar na defesa do organismo contra as ERO/ERN. Os antioxidantes não enzimáticos podem ser endógenos, como a glutathiona (GSH), ou exógenos, como as vitaminas C e E, que são obtidas através da ingestão de alimentos. Estas substâncias fazem parte do sistema antioxidante não enzimático (Hermes-Lima, 2004).

A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular que está presente no fluido extracelular e no citoplasma. Este composto está presente principalmente na sua forma reduzida (GSH), e em menor quantidade na sua forma oxidada (GSSG). A GSH tem um importante papel na ação antioxidante, pois atua sobre o radical $\cdot OH$ e as ERN, bem como auxilia na excreção de xenobióticos. Além disso, a GSH tem importante função na ativação da GPx (Hermes-Lima, 2004). A glutathiona redutase (GR) é uma importante enzima envolvida no ciclo da GSH, sendo responsável pela reciclagem da GSH, através da redução da GSSG. Além da GR, a glutathiona-S-transferase (GST) é outra enzima importante que atua no metabolismo da GSH, catalisando a conjugação da GSH a xenobióticos, facilitando assim a excreção destes (Fig. 7). A proporção GSH/GSSG

varia entre 5 e 150, e pode ser um bom indicador do estado redox da célula (Hermes-Lima, 2004; 2002).

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado como um desequilíbrio entre a concentração de pro-oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, levando a uma interferência no controle e na sinalização redox, podendo gerar danos às biomoléculas (Hansen et al., 2006; Jones, 2006). Fatores ambientais, como poluição química, hipóxia, radiação UV e estresse térmico, podem interferir na produção de ER e no funcionamento do sistema antioxidante, gerando assim estresse oxidativo. Por sua vez, este estresse pode gerar danos em macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA (Fridovich, 1993; Abele *et al.*, 2012).

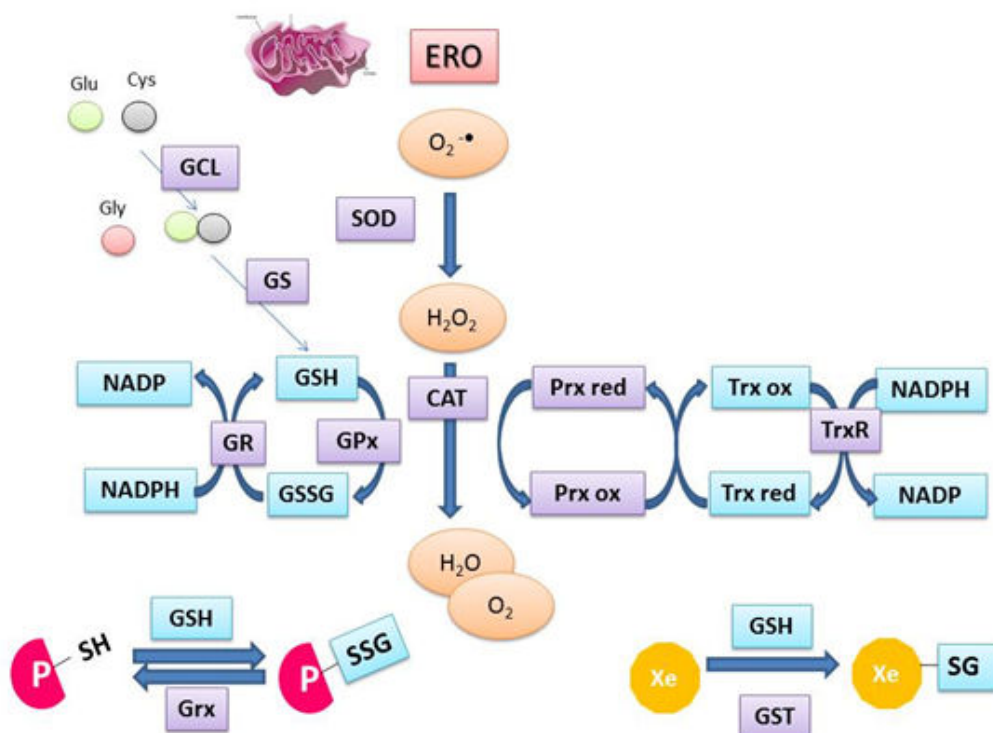


Figura 7. Esquema mostrando os componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema de defesa antioxidante e suas respectivas funções. O esquema mostra também o processo de redução da GSSG pela enzima GR pela doação de um elétron do NADPH e a peroxidase pela oxidação da tioredoxina. Imagem adaptada do Laboratório de Defesa Celular – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

A peroxidação lipídica (LPO) acontece facilmente em ácidos graxos poli-insaturados e é considerada uma das principais causas de dano e morte celular. A LPO acontece com a retirada de um átomo de hidrogênio do grupo metileno dos ácidos graxos poli-insaturados pelo agente oxidante, dando origem ao radical lipídico (L^{\bullet}). Esta fase é chamada de iniciação. No entanto, a LPO pode ser caracterizada por mais duas fases, uma vez que a formação do L^{\bullet} pode propagar a oxidação de ácidos graxos. A propagação constitui a segunda fase da LPO. Nessa fase, o L^{\bullet} reage rapidamente com o O_2 , dando origem ao hidroperóxido lipídico (LOO^{\bullet}). O LOO^{\bullet} reage retirando um hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado, dando origem a mais um L^{\bullet} , reiniciando assim a fase de propagação. Por sua vez, a fase de terminação ocorre com a neutralização dos radicais L^{\bullet} e LOO^{\bullet} por agentes antioxidantes e outros fatores. A LPO gera diversos resíduos tóxicos às biomoléculas, como as proteínas (Gutteridge, 2007; Hermes-Lima, 2004). O malondialdeído é um destes resíduos e pode ser detectado por colorimetria através da sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), indicando assim os níveis de LPO nos tecidos (Oakes & Van Der Kraak, 2003).

As proteínas também podem sofrer modificações por oxidação através da ocorrência de danos em aminoácidos e, conseqüentemente, na estrutura proteica. Portanto, estes danos podem provocar disfunção proteica, inativação enzimática, entre outras conseqüências, podendo inclusive levar à morte celular (Hermes-Lima, 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007). Danos em proteínas podem ser analisados a partir da presença de grupos carbonilas, os quais são produzidos em cadeias laterais de aminoácidos devido à oxidação de seus aminoácidos. Os grupos carbonilas também podem ser adicionados às proteínas pela incorporação do resíduo aldeído, como o MDA produzido durante a LPO. A detecção destes grupos pode ser feita através da ligação de anticorpos e sondas fluorescentes (Buss et al., 1996; 2002). Além da LPO e os danos

proteicos, o estresse oxidativo também pode induzir danos na estrutura do DNA. No entanto, estes danos são menos comuns, uma vez que o DNA apresenta um sistema de reparo dos danos causados por ER (Hermes-Lima, 2004).

Parâmetros de estresse oxidativo têm se mostrado como bons biomarcadores em organismos marinhos submetidos a diferentes tipos de estresse ambiental. Considerando os possíveis efeitos da acidificação marinha e o reduzido número de estudos relacionando a acidificação da água do mar ao estresse oxidativo em hidrocorais, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta no hidrocoral *M. alcicornis* exposto à redução do pH da água do mar através da análise de parâmetros associados ao estresse oxidativo.

Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas do hidrocoral *M. alricornis* à exposição a diferentes cenários de acidificação da água do mar.

Objetivos Específicos

- Analisar a resposta de parâmetros relacionados ao estado oxidativo no hidrocoral *M. alricornis* após exposição a diferentes níveis de acidificação da água do mar;
- Avaliar o potencial dos parâmetros utilizados como biomarcadores adequados ao monitoramento da saúde do hidrocoral frente à redução do pH da água do mar.

Manuscrito

Oxidative stress biomarkers in the hydrocoral *Millepora alcicornis* exposed to CO₂-driven sea water acidification

Débora Camacho Luz¹, Yuri Dornelles Zebral¹, Roberta Daniele Klein², Joseane Aparecida Marques³, Laura Fernandes de Barros Marangoni³, Cristiano Macedo Pereira⁴, Gustavo Adolpho Santos Duarte⁴, Débora de Oliveira Pires⁴, Clovis Barreira e Castro⁴, Emiliano Nicolas Calderon⁴, Adalto Bianchini²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

⁴ Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Parque Quinta da Boa Vista, São Cristovão, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* Este manuscrito deverá ser submetido para publicação na revista **Coral Reefs**

Oxidative stress biomarkers in the hydrocoral *Millepora alcicornis* exposed to CO₂-driven sea water acidification

Débora Camacho Luz¹, Yuri Dornelles Zebral¹, Roberta Daniele Klein², Joseane Aparecida Marques³, Laura Fernandes de Barros Marangoni³, Cristiano Macedo Pereira⁴, Gustavo Adolpho Santos Duarte⁴, Débora de Oliveira Pires⁴, Clovis Barreira e Castro⁴, Emiliano Nicolas Calderon⁴, Adalto Bianchini^{2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

⁴ Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Parque Quinta da Boa Vista, São Cristovão, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* Corresponding author: Adalto Bianchini; Universidade Federal do Rio Grande; Instituto de Ciências Biológicas; Avenida Itália km 8, Campus Carreiros; 96.203-900, Rio Grande RS, Brazil; Phone: +55 53 32935193; e-mail: adaltobianchini@furg.br

Keywords: antioxidant capacity; coral reefs; lipid oxidation; mesocosm; ocean acidification; protein oxidation.

Abstract

Global impacts are affecting negatively coral reefs health worldwide. Ocean acidification associated with the increasing CO₂ partial pressure in the atmosphere can potentially induce oxidative stress with consequent cellular damage in corals and hydrocorals. Therefore, parameters related to oxidative stress were evaluated in the hydrocoral *Millepora alcicornis* exposed to three different levels of sea water acidification using a mesocosm system. CO₂-driven acidification of sea water was performed until reaching 0.3, 0.6 and 0.9 pH units below the current pH of sea water pumped from the coral reef adjacent to the mesocosm. Therefore, treatments corresponded to control (pH 8.1), mild (pH 7.8), intermediate (pH 7.5) and severe (pH 7.2) sea water acidification. After 0, 16 and 30 days of exposure, hydrocorals were collected. The following parameters were analyzed in the hydrocoral holobionts: antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), total glutathione (GSHt) concentration, reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione ratio (GSH/GSSG), lipid peroxidation (LPO) and protein carbonyl group (PC) levels. ACAP was increased in hydrocorals after 16 days of exposure to intermediate level of sea water acidification. GSHt and GSH/GSSG did not change over the experimental period. LPO level was increased in hydrocorals tested for 30 days, irrespective the pH treatment, including the control. PC content was increased in hydrocorals exposed to intermediate and severe sea water acidification for 30 days. These findings indicate that the antioxidant defense system of *M. alcicornis* is capable of dealing with acid stress for a short period of time (16 days). Additionally, they clearly show that a longer period of exposure (30 days) to intermediate or severe sea water acidification induces oxidative stress with consequent oxidative damage to proteins, which could compromise the hydrocoral health.

1. Introduction

Coral reefs are inhabited by a large number of species from the marine flora and fauna. Indeed, they are considered the ecosystem with most richness and diversity of organisms on Earth (Connell, 1976). This ecosystem has great ecological and economical relevance. In fact, around 500,000 people are dependent directly or indirectly on reef corals (Wilkinson, 2008). However, they have been largely impacted by local stressors, especially those associated with human activities such as fishing overexploitation, tourism, increasing human settlement in coastal areas, and chemical pollution. Nevertheless, coral reefs are also being impacted by the effects associated with global stressors, such as those related to climate changes (Halpern et al., 2007).

Climate changes is intimately associated with the anthropogenic emission of greenhouse gases, especially CO₂ (Field et al., 2014). Approximately 30% of the CO₂ atmospheric emissions are absorbed by oceans. As a consequence of the historical increase in the CO₂ emission in the atmosphere, sea water pH has reduced by approximately 0.1 unit since the beginning of the Industrial Era. Additionally, the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) predicts a further reduction in 0.3 units in sea water pH for the next century (Gattuso and Hansson, 2011; Field et al., 2014). Increasing CO₂ concentration in sea water interferes directly in the inorganic dissolved carbon system. After reacting with water, the resulting increased concentration of carbonic acid (H₂CO₃) drives to a rapid increase in the levels of bicarbonate (HCO₃⁻) and proton (H⁺) (Gattuso and Hansson, 2011). In turn, the increased concentration of H⁺ requires a higher activity of the sea water buffer system. In this case, carbonate (CO₃⁻) plays a pivotal role in removing H⁺. As a consequence of H⁺ buffering, increase in HCO₃⁻ concentration and reduction in CO₃⁻ concentration are observed (Gattuso and Hansson, 2011).

Reduction in CO_3^- concentration has negative consequences on the skeleton of calcifying organisms. Indeed, most studies reported in the literature are focused on the understanding of the relationship between pH reduction and formation and maintenance of the calcareous skeleton by these organisms (Cohen et al., 2009; Cohen and Holcomb, 2009; Brown and Edmunds, 2016). However, the understanding of other physiological responses to the increasing concentration of dissolved CO_2 in sea water is needed for a better evaluation of coral reefs' health.

Increase in environmental CO_2 concentration results in reduction of the diffusion gradient existing between the external and internal media (Jokiel, 2011; Hennige et al., 2014). Consequently, there is a higher CO_2 diffusion from the environment into the organism, thus reducing the displacement of this gas in the opposite direction. This would result in increased CO_2 concentration and the consequent bioaccumulation of this gas, which may lead to cellular hypercapnia. As observed in sea water, CO_2 reaction with body fluids will increase the concentrations of H^+ and HCO_3^- (Gattuso and Hansson, 2011; Pörtner et al., 2011). However, acid-base regulation of the intracellular fluid is essential for the adequate functioning of enzymes, which is crucial for several physiological processes such as energy metabolism and calcification (Pörtner et al., 2011; Hennige et al., 2014). The acid-base regulation is energetically expensive and may significantly affect hypometabolic marine invertebrates, such as cnidarians (Cohen and Holcomb, 2009; Gattuso and Hansson, 2011; Freitas et al., 2016).

Among several biochemical/physiological parameters affected by cellular hypercapnia, energy metabolism and reactive oxygen species (ROS) generation are highlighted (Abele et al., 2012; Wäge et al., 2016). Indeed, the intracellular level of protons (H^+) influences directly the oxidative phosphorylation process at the mitochondrial level. H^+ diffusion from the cytoplasm into the mitochondrial

intermembrane space negatively affects the functioning of the electron transporting chain, thus increasing ROS generation (Haider et al., 2016). Therefore, the combination of increased energy consumption associated with acid-base regulation and reduced ATP production associated with intracellular acidification may influence negatively the functioning of the antioxidant defense system. As a consequence of the combination of these factors, the organism can experience an oxidative stress condition, which can result in significant damage to biomolecules, such as lipids, proteins and DNA (Hermes-Lima, 2004).

It is worth noting that increases in ROS generation can also influence negatively the mutualistic relationship between the host and its symbionts. Bleaching in symbiont-bearing reef organisms related to increase in ROS is a current and quite well accepted theory. An elevated generation of ROS by the zooxanthellae photosystem would lead to ROS diffusion into the host tissues. As a protective response, reef organisms would expulse zooxanthellae from their tissues, thus leaving the white calcareous skeleton of the host visually apparent (Downs, 2002). However, up to now this theory was described only for an increased ROS generation after organism's exposure to sea water increasing temperature (Abele et al., 2012; Anthony et al., 2007; Downs et al., 2002; Gates et al., 1992).

In light of the above, understanding of the implications of ocean acidification on ROS generation in reef building organisms is crucial. Therefore, the main goal of the present study was to evaluate the response of parameters related to oxidative stress in the hydrocal *Millepora alcicornis* after exposure to different levels of sea water acidification following IPCC predictions. It is worth noting that *M. alcicornis* is a calcareous hydrozoan found in tropical seas worldwide, where it plays a key environmental role in reef communities (Lewis 1989). Despite this, little information on

the effects of ocean acidification on the physiology of milleporidians is available in the current literature, especially when compared to the knowledge existing for scleractinian corals.

2. Materials and methods

2.1 Organism collection and acclimation

Organism collection and experimentation were performed in cooperation with the Coral Vivo Research Network and using the research facilities of the Coral Vivo Project in Arraial d'Ajuda (Porto Seguro, Bahia, northeastern Brazil). Fragments of 4 colonies of the hydrocoral *M. alcicornis* were collected by Scuba diving at the Recife de Fora Municipal Marine Park (Porto Seguro). Hydrocoral fragments of each colony were carefully fixed in ceramic plates using cyanoacrylate glue. Plates with hydrocorals were randomly assigned to 16 tanks, representing 4 replicates for each treatment. They were maintained in 130-L tanks with continuously running local sea water (~500 L/h) for 20 days, using the marine mesocosm system of the Coral Vivo Project (Duarte et al., 2015; Sarmiento et al., 2015). The experimental set-up employed in the present study was previously reported by Sarmiento et al. (2015).

2.2 Sea water acidification

Four levels of sea water acidification were tested. Sea water pumped from the adjacent coral reef into the mesocosm system had its pH unaltered (control; $p\text{CO}_2 = 351.8 \mu\text{atm}$, pH 8.1) or reduced by 0.3 (mild acidification; $p\text{CO}_2 = 939.0 \mu\text{atm}$; pH 7.8), 0.6 (intermediate acidification; $p\text{CO}_2 = 1683.4 \mu\text{atm}$; pH 7.5) and 0.9 units (severe acidification; $p\text{CO}_2 = 3494.3 \mu\text{atm}$; pH 7.2). These conditions were selected considering the optimist and pessimist scenarios of future ocean acidification within the next

century (Field et al., 2014). Reduction of sea water pH was achieved by CO₂ injection controlled by an automated system (Reef Angel Controller) coupled to pH sensors (Gehaka 09RBCN). Therefore, it is important to note that sea water pH in control and treatments were not fixed. Consequently, sea water acidification treatments were set to be always 0.3, 0.6 and 0.9 pH units below the current pH of sea water being pumped from the coral reef. Every day, physicochemical parameters (temperature, pH, and light intensity) were monitored in the assay tanks. This monitoring was performed as previously described (Sarmiento et al., 2015)).

2.3 Sample collection and preparation

At the beginning (time 0) and after 16 and 30 days, a sample of each hidrocoral genotype was randomly collected from each replicate of each treatment. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen. For biochemical analyses, samples were macerated in liquid nitrogen, as described by Downs (2005). Each sample macerate was separated into aliquots, which were kept in ultrafreezer (-80°C) until analysis. For analysis, each sample macerate was homogenized by ultrasound (sonicator Sonaer) using the appropriate buffer solution, as described below.

2.4 Antioxidant capacity against peroxy radicals

Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) was analyzed as described by Amado et al. (2009), with some modifications. Briefly, sample macerate was homogenized in a buffer solution containing Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) and MgCl₂·6H₂O (5 mM). Protein content in the sample homogenate was determined using a commercial reagent kit based on the Bradford assay (Sigma-Aldrich). Before analysis, protein concentration was adjusted to 0.5 µg/ml. ACAP was determined by fluorescence

(excitation: 485 nm; emission: 525 nm), using 2',7' dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) as the fluorescent probe. The substrate 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP) was added to the reaction mixture to generate peroxy radicals through the thermal decomposition of ABAP. Measurements were performed using a fluorescence microplate reader (Victor 2, Perkin - Elmer). Results were expressed based on the difference between the fluorescence area obtained for the same sample in the presence and in the absence of ABAP.

2.5 Glutathione concentration

Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations were determined using a commercial reagent kit (Sigma-Aldrich). Before analysis, each sample macerate was homogenized in a 5% sulphosalicylic acid solution. Supernatant obtained was collected and 5-fold diluted with deionized water. Absorbance (415 nm) measurements were performed using a microplate reader (ELx 808 Universal Microplate Reader, Bio-Tek Instruments). Total glutathione (GSHt) concentration was expressed in mmol/mg protein. Protein content in the sample homogenate was determined as described above for ACAP measurement. Additionally, the GSH/GSSG ratio was calculated.

2.6 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation (LPO) was measured using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method, as described by Oakes and Van Der Kraak (2003). Sample macerate was homogenized in a 5% acetic acid solution containing 35 µM butylated hydroxytoluene (BHT). According to the method employed, malondialdehyde (MDA) resulting from lipid peroxidation reacts with the thiobarbituric acid (TBA)

under acidic and high temperature (95°C) conditions, thus generating a fluorescent chromogen (excitation: 515 nm; emission: 553 nm). Therefore, measurements were performed using the fluorescence microplate reader. Results were expressed in nmol MDA/mg protein. Protein content in the sample homogenate was determined as described above for ACAP measurement.

2.7 Protein carbonyl groups

Before analysis, sample macerate was homogenized in phosphate buffer solution and the protein content in the sample homogenized was adjusted to 0.2 mg/ml. Oxidative damage to proteins was analyzed using the Protein Carbonyl ELISA kit (MyBioSource, OxiSelect), following procedures described by the manufacturer. Carbonyl-derived substances are the most common product of protein oxidation. Therefore, they are indicative of oxidative damage to proteins. Protein carbonyl groups (PCG) were derivatized with dinitrophenylhydrazine (DNPH) in a 96-well plate. This reaction generated 2,4-dinitrophenyl (DNP) hydrazone, which was labeled with an anti-DNP antibody. Absorbance (450 nm) measurement was performed using the microplate reader. Results were expressed as optical density.

2.8 Data presentation and analysis

For all parameters analyzed, data were expressed as mean \pm standard error. For each parameter analyzed, significant differences among treatments were evaluated using two-way (pH treatment and exposure time) analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. Data normality and homogeneity of variances were previously checked. Data for LPO and PC were mathematically (log) transformed previous analysis. In all cases, the significance level adopted was 95% ($\alpha = 0.05$).

3. Results

Data on sea water physicochemical parameters, including pH, were previously reported by Sarmiento et al. (2015). In fact, the present study was performed simultaneously with that conducted by Sarmiento et al. (2015), and using the same research facilities. It is worth noting that the desired pH treatments were successfully managed throughout the experiment. As expected, mean values of sea water pH in the control, mild, intermediate and severe acidification corresponded to 8.1, 7.8, 7.5 and 7.2, respectively.

Regarding biochemical/physiological parameters, ACAP was significantly higher in hydrocorals exposed to intermediate level of sea water acidification for 16 days (Fig. 1). No significant changes in GSht (Fig. 2) and GSH/GSSG (Fig. 3) were observed over the experimental period. LPO level was significantly higher in hydrocorals exposed for 30 days, irrespective the pH treatment tested. Additionally, no significant change in LPO level was observed among pH treatments at the different exposure times (Fig. 4). PC level was dependent on the level of sea water acidification in hydrocorals exposed for 30 days. Indeed, significantly increased PC levels were observed in hydrocorals exposed to intermediate and severe levels of sea water acidification (Fig. 5).

4. Discussion

In the present study, we evaluated changes in some parameters related to the redox status and the presence of oxidative damage to biomolecules in the hydrocoral *M. alricornis* after exposure to different levels of pCO₂-driven sea water acidification (8.1-7.2). Our findings clearly indicate that the hydrocoral *M. alricornis* is capable of dealing

with acid stress only at some extent. This statement is based on the fact that no significant increase in oxidative damage to lipids (LPO) and proteins (PC) were observed in hydrocorals exposed to any level of sea water acidification (>pH 7.2) for a short-period of time (16 days), as well as in those exposed to mild level of sea water acidification (pH 7.8) for a longer period of time (30 days).

It is interesting to note that hydrocorals exposed to mild and intermediate levels of sea water acidification for a short-period of time (16 days) showed increased ACAP. However, no significant changes were observed in ACAP in hydrocorals exposed to a severe level of sea water acidification for 16 days. Furthermore, a lack of ACAP response was also observed in hydrocorals exposed for a longer period of time (30 days) to any level of sea water acidification. As further discussed, a plausible explanation for this limited response of *M. alcicornis* to acid stress would be associated with a possible energy constraint during chronic exposure to any level of sea water acidification or acute exposure to severe reductions in sea water pH. Additionally, the involvement of other ROS than peroxy radicals cannot be disregarded.

The maintenance and activation of the antioxidant system can be considered as a high energy demanding process. Indeed, it is composed by a complex and integrated system of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Among these antioxidants, GSH can be highlighted. This tripeptide is made up of the three amino acids (cysteine, glycine and glutamate), has a low molecular weight, and play a pivotal and crucial role in cellular redox status (Hermes-Lima, 2004). GSH is found in both extracellular and intracellular fluids, mostly in its reduced form (GSH) and in less quantity in its oxidized form (GSSG). This tripeptide acts by scavenging hydroxyl radicals and nitrogen reactive species. It is also involved in the excretion of xenobiotics and play a role as cofactor during the activation of glutathione peroxidase (GPx), an important enzymatic

antioxidant (Hermes-Lima, 2004). In the present study, no significant changes were observed in GSHt and GSH/GSSG ratio after exposure to any level of sea water acidification for a short- (16 days) and long-term (30 days) exposure to reduced sea water pH down to 7.2. These findings clearly indicate that neither GSH concentration nor GSSG concentration was affected by acid stress in the hydrocoral *M. alcornis* under the experimental conditions employed in the present study.

In light of the above, the involvement of other non-enzymatic antioxidants than GSH, such as vitamin E, must be considered in order to explain the increased ACAP observed in hydrocorals exposed to intermediate level of sea water acidification for a shorter period of time (16 days). Also, the possible involvement of any component of the enzymatic antioxidant system, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), and GPx cannot be ruled out. Indeed, the oxidative stress evidenced by the significantly increased oxidative damage to proteins (PC) observed in hydrocorals exposed to intermediate and severe levels of sea water acidification for a longer period of time (30 days) was paralleled by a lack of change in ACAP. This finding reinforces the idea that the involvement of other antioxidants not evaluated in the present study, as well as the antioxidant capacity against other ROS than peroxy radicals must be considered when interpreting the response of *M. alcornis* to acid stress. Indeed, a lack of change in GSH concentration and oxidative damage to lipids paralleled by increases in SOD and CAT activities were recently reported in the sea anemone *Exaiptasia pallida* and the polychaeta *Hediste diversicolor* exposed to intermediate levels of sea water acidification (Siddiqui and Bielmyer-Fraser, 2015; Freitas et al., 2016). It is important to note that both SOD and CAT are key enzymes of the antioxidant system, being responsible for hydroxyl radicals scavenging (Amstrong, 2002).

At this point, it is important to note that protein carbonylation, as observed in the present study with *M. alvicornis*, is considered as to be an irreversible damage. Indeed, the presence of carbonyl groups leads protein to enter the degradation pathway, which includes several enzymes and proteins, such as heat shock proteins (hsp60) and proteasomes. It is worth noting that this is an energy demanding process (Costa et al., 2007). This reinforces the idea that a plausible explanation for the observed limited response of *M. alvicornis* to acid stress may be linked to a possible decrease in the energy available to induce the antioxidant defense system during chronic exposure to any level of sea water acidification or acute exposure to severe reductions in sea water pH.

Additionally to the oxidative damage observed in proteins, it is worth noting that a tendency of increased LPO was also observed in hydrocorals exposed to increasing sea water acidification for 30 days. It is possible that the lack of significant differences in LPO among pH treatments was due the increased LPO observed in hydrocorals maintained in natural sea water. A possible explanation for this increased LPO could be the higher values of temperature observed in the second half of the experimental time, as previously reported by Sarmiento et al. (2015). In fact, increasing water temperature was shown to induce LPO in several species of cnidarians (Gates et al., 1992; Brown, 1997; Anthony et al., 2007; Downs et al., 2002; Faxneld et al., 2011; Abele et al., 2012).

Considering the findings reported in the present study, we can conclude that the antioxidant defense system of the hydrocoral *M. alvicornis* is capable of dealing with acid stress only for a short period of time (16 days). However, they clearly show that a longer period of exposure (30 days) to intermediate or severe sea water acidification induces oxidative stress, with consequent damage to proteins, which could compromise the hydrocoral health. Additionally, our findings indicate the need for future studies

focused on the effect of sea water acidification on other non-enzymatic and enzymatic antioxidants than GSH, as well as the energy metabolism of the hydrocoral *M. alcicornis*.

Acknowledgements

The International Development Research Centre (IDRC, Ottawa, Canada; grant # 104519-003), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Programa Ciências do Mar, Brasília, DF, Brazil; grant # 84/2010) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática, Brasília, DF, Brazil; grant # 573949/2008-5) are acknowledged for their financial support. The Coral Vivo Project and its sponsors Petrobras, through the Petrobras Environmental Program, and Arraial d’Ajuda Eco Parque are acknowledged for their support in field research. A. Bianchini (Proc. # 304430/2009-9) and C.B. Castro (Proc. #303970/2010-3) are research fellows from the Brazilian CNPq. A. Bianchini is supported by the International Canada Research Chair Program (IDRC). D.C. Luz was a graduate fellow from CAPES.

References

- Abele D, Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T (2012) Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. Wiley-Blackwell, Hoboken
- Allemand D, Tambutté É, Zoccola D, Tambutté S (2011) Coral calcification, cells to reefs. In: Z Dubinsky, N Stambler (eds) Coral Reefs: An Ecosystem in Transition. Springer, Dordrecht, pp. 119-150
- Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monserrat JM (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 407: 2115-2123
- Amaral FD, Steiner AQ, Broadhurst MK, Cairns SD (2008) An overview of the shallow-water calcified hydroids from Brazil (Hydrozoa: Cnidaria), including the description of a new species. *Zootaxa* 1930: 56-68

- Anthony K, Connolly SR, Hoegh-Guldberg O (2007) Bleaching, energetics, and coral mortality risk: Effects of temperature, light, and sediment regime. *Limnol Oceanogr* 52: 716-726
- Barott KL, Venn AA, Perez SO, Tambutté S, Tresguerres M (2015) Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 112: 607-612
- Bellwood DR, Hughes TP, Folke C, Nyström M (2004) Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429: 827-833.
- Borg DC (1993) Oxygen Free Radicals and Tissue Injury. In: Tarr M, Samson F (eds) *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage*, Birkhäuser Boston, Boston
- Boron WF (2004) Regulation of intracellular pH. *AJP Adv Physiol Educ* 28: 160-179.
- Braidot E, Petrucci E, Vianello A, Macrí F (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Lett* 451, 347-350.
- Brown BE (1997) Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* 16: S129-S138.
- Brown D, Edmunds PJ (2016) Differences in the responses of three scleractinians and the hydrocoral *Millepora platyphylla* to ocean acidification. *Mar Biol* 163: 62
- Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC (1996) Protein carbonyl measurement by a sensitive elisa method. *Free Rad Biol Med* 23: 361-366
- Cao L, Caldeira K (2008) Atmospheric CO₂ stabilization and ocean acidification. *Geophys Res Lett* 35: L19609
- Castro CB, Zilberbeg C (2016) Recifes brasileiros, sua importância e conservação. In: Zilberberg C, Pinto A, Marques JA, Feitosa L, Marangoni L (eds) *Conhecendo os recifes brasileiros. Rede de Pesquisas Coral Vivo. Série Livros 58*, Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp. 17-26
- Cohen AL, Holcomb M (2009) Why corals care about ocean acidification: uncovering the mechanism. *Oceanography* 22: 118-127
- Cohen AL, McCorkle DC, de Putron S., Gaetani GA, Rose KA (2009) Morphological and compositional changes in the skeletons of new coral recruits reared in acidified seawater: Insights into the biomineralization response to ocean acidification. *Geochem Geophys Geosystems* 10: 1-12
- Costa V, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. (2007). Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life* 59: 293-298
- Davy SK, Allemand D, Weis VM (2012) Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 229-261

Downs CA (2005) Cellular diagnostics and its application to aquatic and marine toxicology. In: Ostrander GK (ed) *Techniques in Aquatic Toxicology*, CRC Press, Boca Raton, pp. 101-208.

Downs CA, Fauth JE, Halas JC, Dustan P, Bemiss J, Woodley CM (2002) Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Rad Biol Med* 33: 533-543

Downs CA, Woodley CM, Richmond RH, Lanning LL, Owen R (2005) Shifting the paradigm of coral-reef "health" assessment. *Mar Pollut Bull* 51: 486-494.

Duarte G, Calderon EN, Pereira CM, Marangoni LFB, Santos HF, Peixoto RS, Bianchini A, Castro CB (2015) A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecol Evol* 5: 4555-4566

Fabricius K, De'ath G, McCook L, Turak E, Williams DM (2005) Changes in algal, coral and fish assemblages along water quality gradients on the inshore Great Barrier Reef *Mar Pollut Bull* 51: 384-398

Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, Orr JC (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J Mar Sci J Cons* 65: 414-432

Faxneld S, Jörgensen TL, Nguyen ND, Nyström M, Tedengren M (2011) Differences in physiological response to increased seawater temperature in nearshore and offshore corals in northern Vietnam. *Mar Environ Res* 71: 225-233

Ferreira BP, Maida M (2006) *Monitoramento dos Recifes de Coral do Brasil: Situação Atual e Perspectivas*, MMA/SBF, Brasília

Field CB, Barros VR, Dokken DJ, Mastrandrea MD, Bilir TE, Chatterjee M, Ebi KL, Estrada YO, Genova RC, Girma B, et al. (2014). *Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part A*, Cambridge University Press, New York

Fitt WK, Warner ME (1995) Bleaching patterns of four species of Caribbean reef corals. *Biol Bull* 189: 298-307

Freitas R, Pires A, Moreira A, Wrona FJ, Figueira E, Soares AMVM (2016) Biochemical alterations induced in *Hediste diversicolor* under seawater acidification conditions. *Mar Environ Res* 117: 75-84

Fridovich I (1993) Getting Along with Oxygen. In: Tarr M, Samson F (eds) *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage*, Birkhäuser Boston, Boston

Gates RD, Baghdasarian G, Muscatine L (1992) Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: Implications for coral bleaching. *Biol Bull* 182: 324-332

Gattuso J-P, Hansson L (2011) *Ocean acidification*, Oxford University Press, New York

Haider F, Falfushynska H, Ivanina AV, Sokolova IM (2016) Effects of pH and bicarbonate on mitochondrial functions of marine bivalves. *Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol* 198: 41-50

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York

Halpern BS, Selkoe KA, Micheli F, Kappel CV (2007). Evaluating and ranking the vulnerability of global marine ecosystems to anthropogenic threats. *Conserv Biol* 21: 1301-1315

Hennige S, Roberts JM, Williamson P (2014) *An Updated Synthesis of the Impacts of Ocean Acidification on Marine Biodiversity*. Technical Series No. 75, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal

Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: Storey KB (ed) *Functional Metabolism Regulation and Adaptation*, John Wiley & Sons, Hoboken, pp. 319-368

Hetzel B, Castro CB, Leão ZM (1994). *Corais do Sul da Bahia*, Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro

Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshw Res* 50, 839-866

Hughes TP (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301, 929-933

Jokiel PL (2011) The reef coral two compartment proton flux model: A new approach relating tissue-level physiological processes to gross corallum morphology. *J Exp Mar Biol Ecol* 409, 1-12

Jokiel PL, Coles SL (1990) Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs* 8: 155-162

Kaniewska P, Campbell PR, Kline DI, Rodriguez-Lanetty M, Miller DJ, Dove S, Hoegh-Guldberg O (2012). Major cellular and physiological impacts of ocean acidification on a reef building coral. *PLoS ONE* 7: e34659

Kleypas JA, Feely RA, Fabry VJ, Langdon C, Sabine CL, Robbins LL (2005) Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research. Report of a workshop held 18–20 April 2005, St. Petersburg, 88 pp.

Knowlton N, Brainard RE, Fisher R, Moews M, Plaisance L (2010) Coral reef biodiversity. In: McIntyre A (ed) *Life in the World's Oceans: Diversity, Distribution, and Abundance*, Wiley-Blackwell Chichester, pp. 65-77

Leal ICS, Araújo ME, Cunha SR, Pereira PHC (2015). The influence of fire-coral colony size and agonistic behaviour of territorial damselfish on associated coral reef fish communities. *Mar Environ Res* 108, 45-54

Leão Z, Kikuchi RKP, Oliveira MDM (2008) Branqueamento de corais nos recifes da Bahia e sua relação com eventos de anomalias térmicas nas águas superficiais do oceano. *Biota Neotropica* 8: 69-82

- Leão ZMAN, Kikuchi RKP, Testa V (2003) Corals and coral reefs of Brazil. In: Cortés J (ed) Latin American Coral Reefs, Elsevier, Amsterdam, pp. 9-52
- Lesser MP (2004) Experimental biology of coral reef ecosystems. *J Exp Mar Biol Ecol* 300: 217-252
- Lewis JB (2006) Biology and ecology of the hydrocoral millepora on coral reefs. *Adv Mar Biol* 50: 1-55
- Loya Y, Rinkevich B (1980) Effects of oil pollution on coral reef communities. *Mar Ecol Prog Ser* 3: 167-180
- Marangoni LFB (2014) Biomarcadores para Avaliação dos Efeitos do Cobre no Coral *Mussismila harttii* (Cnidaria, Scleractinia, Mussidae). MSc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande
- Marangoni LFB, Marques JA, Bianchini A (2016) Fisiologia de corais: A simbiose coral-zooxantela, o fenômeno, de branqueamento e o processo de calcificação. In: Zilberberg C, Pinto A, Marques JA, Feitosa L, Marangoni L (eds) Conhecendo os recifes brasileiros. Rede de Pesquisas Coral Vivo. Série Livros 58, Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp. 54-71
- Marques JA (2014) Resposta de biomarcadores em *Amphistegina spp.* (Amphisteginidae, Foraminifera) expostos ao cobre e acidificação marinha. MSc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande
- Martinez-Cruz O, Muhlia-Almazan A, Sanchez-Paz A, Garcia-Carreño F, Jimenez-Gutierrez L, Toro MAN (2012) Invertebrates mitochondrial function and energetic challenges. In: Clark K (ed), Bioenergetics, Intech Open Access Publisher, Rijeka
- Moberg F, Folke C (1999) Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecol Econ* 29: 215-233
- Muscantine L, Porter JW (1977) Reef corals: Mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *BioScience* 27, 454-460
- NOAA (2015) Trends in Atmospheric Carbon Dioxide - Global. National Oceanic and Atmospheric Administration. Available in: http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html#global_data. Accessed on December 05, 2015
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ (2003) Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 63, 447-463
- Odum HT, Odum EP (1955) Trophic structure and productivity of a windward coral reef community on Eniwetok Atoll. *Ecol. Monogr.* 25, 291-320
- Pörtner HO, Langenbuch M, Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology and earth history. *J Oceanogr* 60: 705-718

Pörtner H-O, Gutowska M, Ishimatsu A, Lucassen M, Melzner F, Seibel B (2011) Effects of ocean acidification on nektonic organisms. In: Gattuso J-P, Hanson L (eds) Ocean Acidification, Oxford University Press, New York, pp. 154-175

Reipschläger A, Pörtner H-O (1996) Metabolic depression during environmental stress: The role of extracellular versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. J Exp Biol 199: 1801-1807

Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD (2005). Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva, Roca, São Paulo

Sarmiento VC, Souza TP, Esteves AM, Santos PJP (2015) Effects of seawater acidification on a coral reef meiofauna community. Coral Reefs 34: 955-966

Siddiqui S, Bielmyer-Fraser GK (2015) Responses of the sea anemone, *Exaiptasia pallida*, to ocean acidification conditions and copper exposure. Aquat Toxicol 167: 228-239

Starkov AA (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. Ann NY Acad Sci 1147, 37-52

Stat M, Morris E, Gates RD (2008) Functional diversity in coral-dinoflagellate symbiosis. Proc Natl Acad Sci 105: 9256-9261

van Dam JW, Negri AP, Uthicke S, Mueller JF (2011) Chemical pollution on coral reefs: Exposure and ecological effects. In: Sanchez-Bayo F, van den Brink PJ, Mann RM (eds) Ecological Impacts of Toxic Chemicals. Bentham Science Publishers, Potomac, pp. 187-211

Wäge J, Lerebours A, Hardege JD, Rotchell JM (2016) Exposure to low pH induces molecular level changes in the marine worm, *Platynereis dumerilii*. Ecotoxicol Environ Saf 124: 105-110

Wilkinson C (2008) Status coral reef of the world:2008, Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Centre, Townsville

(2002). Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols (Totowa, N.J: Humana Press).

Figure Legends

Figure 1. Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) in the hydrocoral *Millepora alcicornis*. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 4). Lowercase letters indicate significant different mean values among levels of sea water acidification for each exposure time (p < 0.05). Capital letters indicate significant different mean values among exposure times for the same pH treatment (p < 0.05)

Figure 2. Total glutathione (GSHt) concentration in the hydrocoral *Millepora alcicornis*. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 4). Lowercase letters indicate significant different mean values among levels of sea water acidification for each exposure time (p < 0.05). Capital letters indicate significant different mean values among exposure times for the same pH treatment (p < 0.05)

Figure 3. GSH/GSSH ratio in the hydrocoral *Millepora alcicornis*. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 4). Lowercase letters indicate significant different mean values among levels of sea water acidification for each exposure time (p < 0.05). Capital letters indicate significant different mean values among exposure times for the same pH treatment (p < 0.05)

Figure 4. Lipid peroxidation (LPO) in the hydrocoral *Millepora alcicornis*. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 4). Lowercase letters indicate significant different mean values among levels of sea water acidification for each exposure time (p < 0.05). Capital letters indicate significant different mean values among exposure times for the same pH treatment (p < 0.05).

Figure 5. Protein carbonyl groups (PC) concentration in the hydrocoral *Millepora alcornis*. Data are expressed as mean \pm standard error (n = 4). Lowercase letters indicate significant different mean values among levels of sea water acidification for each exposure time (p < 0.05). Capital letters indicate significant different mean values among exposure times for the same pH treatment (p < 0.05).

Figures

Figure 1

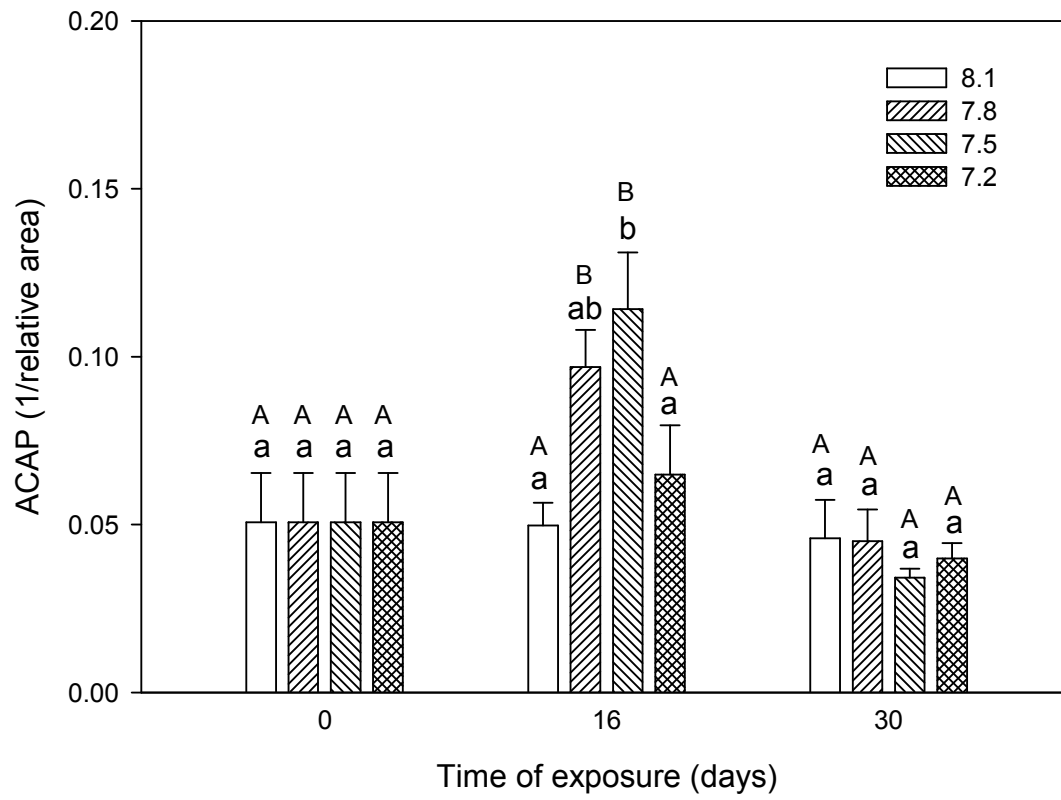


Figure 2

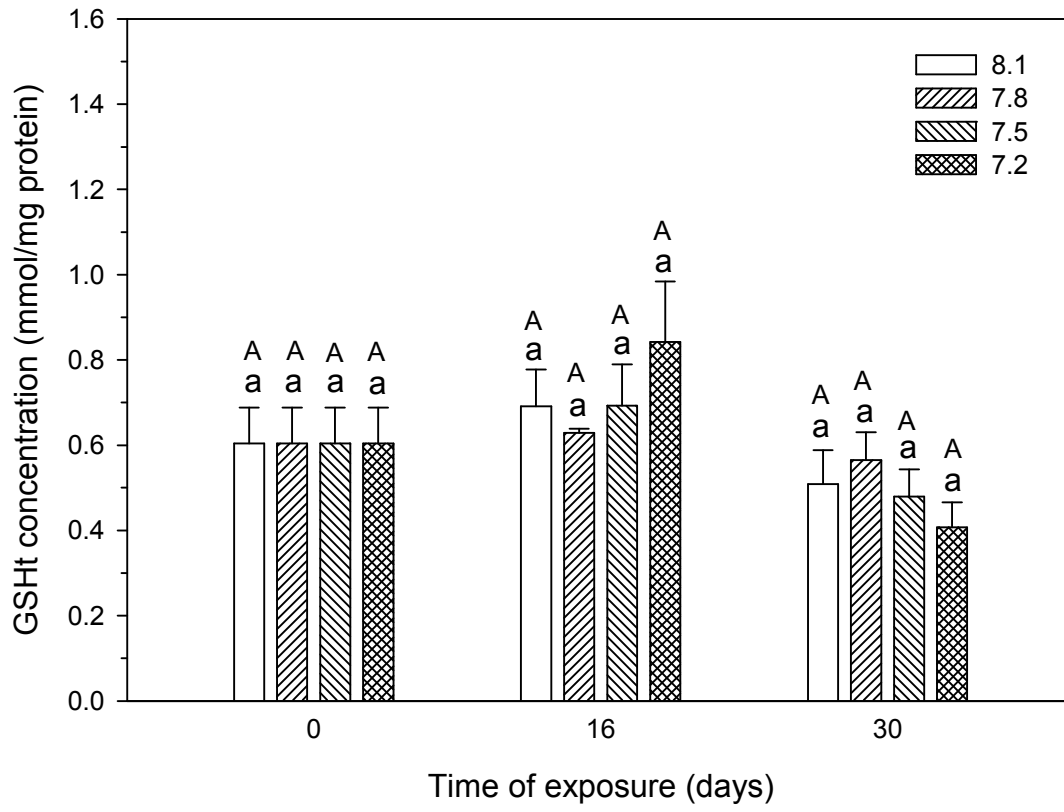


Figure 3

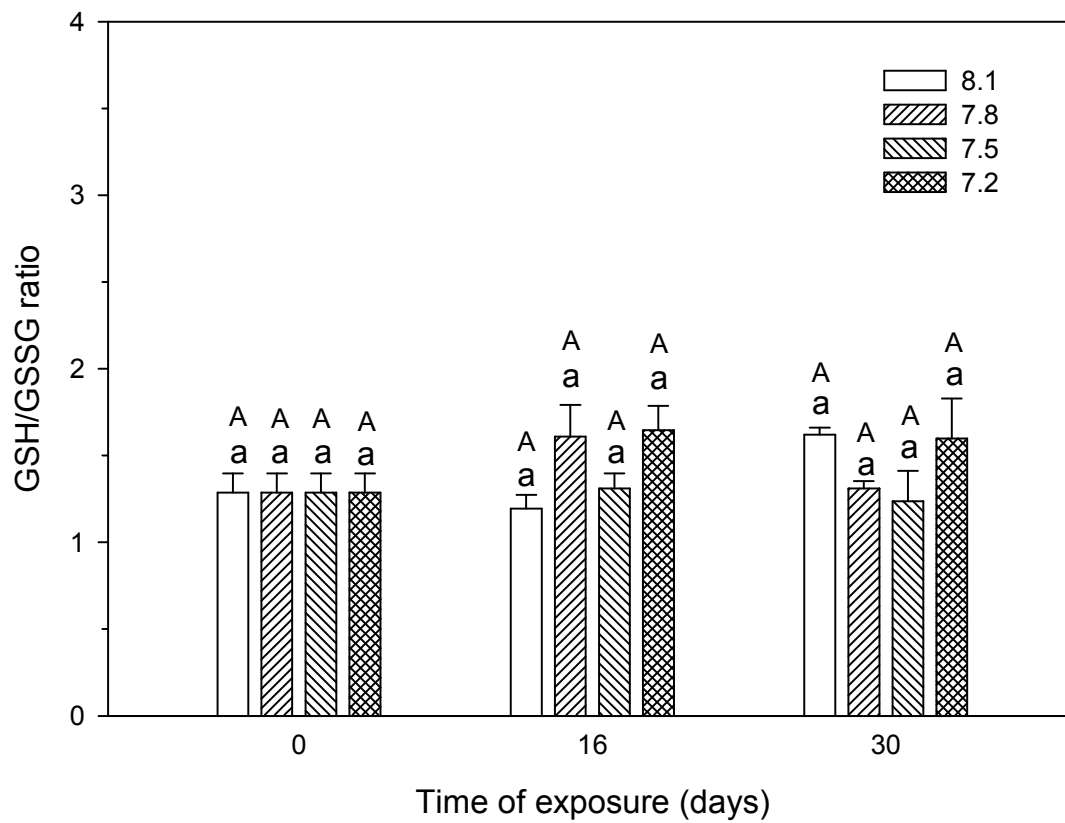


Figure 4

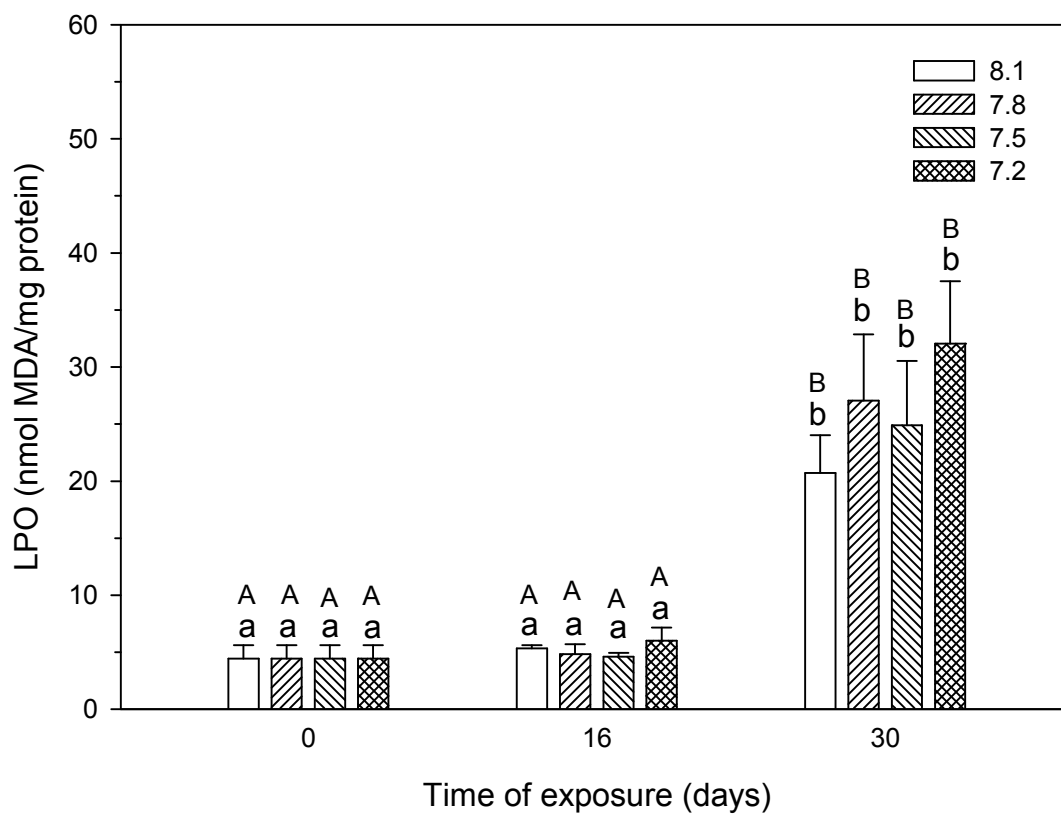
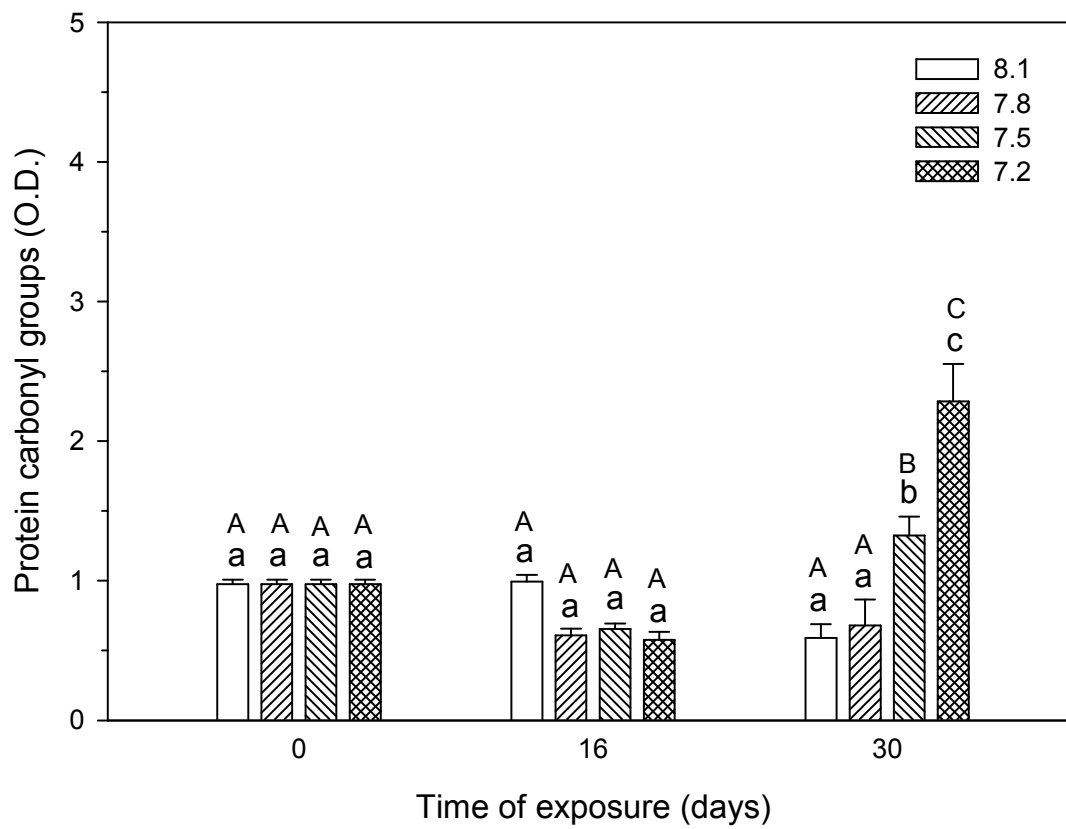


Figure 5



Discussão Geral

Os dados gerados no presente estudo evidenciam que o sistema de defesa antioxidante de *Millepora alcicornis* responde de forma positiva e protege as biomoléculas (lipídios e proteínas) deste hidrocoral contra danos oxidativos frente à exposição do organismo à acidificação da água do mar ($\text{pH} > 7,2$), por um curto período de tempo (16 dias). No entanto, estes dados também demonstram que este sistema de defesa antioxidante não é capaz de proteger os tecidos do holobionte contra as espécies reativas, após uma exposição mais prolongada (30 dias) à acidificação em níveis intermediário ($\text{pH} 7,5$) e severo ($\text{pH} 7,2$) da água do mar. Neste caso, observa-se um aumento no dano oxidativo em biomoléculas, especialmente as proteínas. Portanto, estes resultados são de grande importância para um melhor entendimento do impacto da acidificação marinha na saúde de hidrocorais.

Apesar da contribuição significativa aportada pelo presente estudo para uma avaliação da capacidade de resposta do hidrocoral *M. alcicornis* à acidificação marinha, estudos futuros visando à análise de outros parâmetros relacionados ao balanço oxidativo nos tecidos do hidrocoral, tais como a atividade de enzimas do sistema antioxidante e outros antioxidantes não enzimáticos não abordados no presente estudo, são necessários para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na proteção destes organismos contra os potenciais danos oxidativos induzidos pela exposição à acidificação da água do mar. Além disso, futuros estudos que avaliem os efeitos da acidificação da água do mar no metabolismo energético podem auxiliar na interpretação da capacidade limitada demonstrada do hidrocoral *M. alcicornis* frente à acidificação da água do mar, especialmente após um longo período de exposição a esta condição ambiental.

Bibliografia Geral

Abele, D., Vazquez-Medina, J.P., and Zenteno-Savin, T. (2012). Oxidative stress in aquatic ecosystems (Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell).

Allemand, D., Tambutté, É., Zoccola, D., and Tambutté, S. (2011). Coral Calcification, Cells to Reefs. In *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*, Z. Dubinsky, and N. Stambler, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 119–150.

Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., and Monserrat, J.M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115–2123.

Amaral, F.D., Steiner, A.Q., Broadhurst, M.K., and Cairns, S.D. (2008). An overview of the shallow-water calcified hydroids from Brazil (Hydrozoa: Cnidaria), including the description of a new species. *Zootaxa* 1930, 56–68.

Anthony, K., Connolly, S.R., and Hoegh-Guldberg, O. (2007). Bleaching, energetics, and coral mortality risk: Effects of temperature, light, and sediment regime. *Limnol. Oceanogr.* 52, 716–726.

Barott, K.L., Venn, A.A., Perez, S.O., Tambutté, S., and Tresguerres, M. (2015). Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 607–612.

Bellwood, D.R., Hughes, T.P., Folke, C., and Nyström, M. (2004). Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429, 827–833.

Borg, D.C. (1993). Oxygen Free Radicals and Tissue Injury. In *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage*, M. Tarr, and F. Samson, eds. (Boston, MA: Birkhäuser Boston), p.

Boron, W.F. (2004). Regulation of intracellular pH. *AJP Adv. Physiol. Educ.* 28, 160–179.

Braidot, E., Petrusa, E., Vianello, A., and Macrí, F. (1999). Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Lett.* 451, 347–350.

Brown, B.E. (1997). Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* 16, S129–S138.

Brown, D., and Edmunds, P.J. (2016). Differences in the responses of three scleractinians and the hydrocoral *Millepora platyphylla* to ocean acidification. *Mar. Biol.* 163.

Buss, H., Chan, T.P., Sluis, K.B., Domigan, N.M., and Winterbourn, C.C. (1996). Protein Carbonyl measurement by a sensitive elisa method. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 361–366.

Cao, L., and Caldeira, K. (2008). Atmospheric CO₂ stabilization and ocean acidification. *Geophys. Res. Lett.* 35.

Castro, C.B. e, and Zilberbeg, C. (2016). Recifes braileiros, sua importância e conservação. In *Conhecendo Os Recifes de Corais Brasileiros: Rede de Pesquisa Coral Vivo.*, (Rio de Janeiro, RJ, Brazil: Museu Nacional), pp. 17–26.

Cohen, A.L., and Holcomb, M. (2009). Why corals care about ocean acidification: uncovering the mechanism.

Cohen, A.L., McCorkle, D.C., de Putron, S., Gaetani, G.A., and Rose, K.A. (2009). Morphological and compositional changes in the skeletons of new coral recruits reared in acidified seawater: Insights into the biomineralization response to ocean acidification. *Geochem. Geophys. Geosystems* *10*, n/a-n/a.

Costa, V., Quintanilha, A., and Moradas-Ferreira, P. (2007). Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life* *59*, 293–298.

van Dam, J.W., Negri, A.P., Uthicke, S., and Mueller, J.F. (2011). Chemical pollution on coral reefs: exposure and ecological effects. *Ecol. Impact Toxic Chem.* 187–211.

Davy, S.K., Allemand, D., and Weis, V.M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *76*, 229–261.

Downs, C.A. (2005). Cellular Diagnostics and Its Application to Aquatic and Marine Toxicology. In *Techniques in Aquatic Toxicology*, (EUA: Gary K. Ostrander), pp. 101–208.

Downs, C.A., Fauth, J.E., Halas, J.C., Dustan, P., Bemiss, J., and Woodley, C.M. (2002). Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radic. Biol. Med.* *33*, 533–543.

Downs, C.A., Woodley, C.M., Richmond, R.H., Lanning, L.L., and Owen, R. (2005). Shifting the paradigm of coral-reef “health” assessment. *Mar. Pollut. Bull.* *51*, 486–494.

Duarte, G., Calderon, E.N., Pereira, C.M., Marangoni, L.F.B., Santos, H.F., Peixoto, R.S., Bianchini, A., and Castro, C.B. (2015). A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecol. Evol.* *5*, 4555–4566.

Fabricius, K., De’ath, G., McCook, L., Turak, E., and Williams, D.M. (2005). Changes in algal, coral and fish assemblages along water quality gradients on the inshore Great Barrier Reef. *Mar. Pollut. Bull.* *51*, 384–398.

Fabry, V.J., Seibel, B.A., Feely, R.A., and Orr, J.C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES J. Mar. Sci. J. Cons.* *65*, 414–432.

Faxneld, S., Jörgensen, T.L., Nguyen, N.D., Nyström, M., and Tedengren, M. (2011). Differences in physiological response to increased seawater temperature in nearshore and offshore corals in northern Vietnam. *Mar. Environ. Res.* *71*, 225–233.

Ferreira, B.P., and Maida, M. (2006). Monitoramento dos recifes de coral do Brasil: situação atual e perspectivas (Brasília: MMA/SBF).

- Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., et al. (2014). Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part A, Part A, (New York: Cambridge University Press).
- Fitt, W.K., and Warner, M.E. (1995). Bleaching patterns of four species of Caribbean reef corals. *Biol. Bull.* *189*, 298–307.
- Freitas, R., Pires, A., Moreira, A., Wrona, F.J., Figueira, E., and Soares, A.M.V.M. (2016). Biochemical alterations induced in *Hediste diversicolor* under seawater acidification conditions. *Mar. Environ. Res.* *117*, 75–84.
- Fridovich, I. (1993). Getting Along with Oxygen. In *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage*, M. Tarr, and F. Samson, eds. (Boston, MA: Birkhäuser Boston), p.
- Gates, R.D., Baghdasarian, G., and Muscatine, L. (1992). Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Biol. Bull.* *182*, 324–332.
- Gattuso, J.-P., and Hansson, L. (2011). *Ocean acidification* (Oxford [England]; New York: Oxford University Press).
- Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine* (Oxford ; New York: Oxford University Press).
- Haider, F., Falfushynska, H., Ivanina, A.V., and Sokolova, I.M. (2016). Effects of pH and bicarbonate on mitochondrial functions of marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *198*, 41–50.
- Halpern, B.S., Selkoe, K.A., Micheli, F., and Kappel, C.V. (2007). Evaluating and Ranking the Vulnerability of Global Marine Ecosystems to Anthropogenic Threats. *Conserv. Biol.* *21*, 1301–1315.
- Hansen, J.M., Go, Y.-M., and Jones, D.P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *46*, 215–234.
- Hennige S, Roberts JM, Williamson P (2014) An Updated Synthesis of the Impacts of Ocean Acidification on Marine Biodiversity. Technical Series No. 75, Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Canada.
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In *Functional Metabolism Regulation and Adaptation*, (Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons), pp. 319–368.
- Hetzl, B., Castro, C.B. e, and Leão, Z.M. (1994). *Corais do sul da Bahia* (Rio de Janeiro, RJ, Brazil: Editora Nova Fronteira).
- Hoegh-Guldberg, O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshw. Res.* *50*, 839-866.

- Hughes, T.P. (2003). Climate Change, Human Impacts, and the Resilience of Coral Reefs. *Science* 301, 929–933.
- Jokiel, P.L. (2011). The reef coral two compartment proton flux model: A new approach relating tissue-level physiological processes to gross corallum morphology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 409, 1–12.
- Jokiel, P.L., and Coles, S.L. (1990). Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs* 8, 155–162.
- Jones, D.P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1865–1879.
- Kaniewska, P., Campbell, P.R., Kline, D.I., Rodriguez-Lanetty, M., Miller, D.J., Dove, S., and Hoegh-Guldberg, O. (2012). Major Cellular and Physiological Impacts of Ocean Acidification on a Reef Building Coral. *PLoS ONE* 7, e34659.
- Kleypas, J.A., Feely, R.A., Fabry, V.J., Langdon, C., Sabine, C.L., and Robbins, L.L. (2005). Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research. In Report of a Workshop Held, p. 20.
- Knowlton, N., Brainard, R.E., Fisher, R., Moews, M., and Plaisance, L. (2010). Coral Reef Biodiversity. In *Life in the World's Oceans: Diversity, Distribution, and Abundance*, (Chichester; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub.), pp. 65–77.
- Leal, I.C.S., Araújo, M.E. de, Cunha, S.R. da, and Pereira, P.H.C. (2015). The influence of fire-coral colony size and agonistic behaviour of territorial damselfish on associated coral reef fish communities. *Mar. Environ. Res.* 108, 45–54.
- Leão, Z., Kikuchi, R.K.P. de, and Oliveira, M. de D.M. de (2008). Branqueamento de corais nos recifes da Bahia e sua relação com eventos de anomalias térmicas nas águas superficiais do oceano. *Biota Neotropica* 8, 69–82.
- Leão, Z.M.A.N., Kikuchi, R.K.P., and Testa, V. (2003). Corals and coral reefs of Brazil. In *Latin American Coral Reefs*, (Elsevier), pp. 9–52.
- Lesser, M.P. (2004). Experimental biology of coral reef ecosystems. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300, 217–252.
- Lewis, J.B. (2006). Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. In *Advances in Marine Biology*, (San Diego: Academic Press), pp. 3–55.
- Loya, Y., and Rinkevich, B. (1980). Effects of oil pollution on coral reef communities. *Mar Ecol Prog Ser* 3, 180.
- Marangoni, L.F. de B. (2014). Biomarcadores para avaliação dos efeitos do cobre no coral *Mussismila Harttii* (Cnidaria, Scleractinia, Mussidae). Universidade Federal do Rio Grande.
- Marangoni, L.F. de B., Marques, J.A., and Bianchini, A. (2016). Fisiologia de Corais: a simbiose coral-zooxantela, o fenômeno, de branqueamento e o processo de calcificação. In *Conhecendo Os Recifes de Corais Brasileiros: Rede de Pesquisa Coral Vivo*, (Rio de Janeiro, RJ, Brazil: Museu Nacional), pp. 54–71.

- Marques, J.A. (2014). Resposta de biomarcadores em *Amphistegina spp.* (Amphisteginidae, Foraminifera) expostos ao cobre e acidificação marinha. Universidade Federal do Rio Grande.
- Martinez-Cruz, O., Muhlia-Almazan, A., Sanchez-Paz, A., Garcia-Carreño, F., Jimenez-Gutierrez, L., and Toro, M. de los A.N. del (2012). Invertebrates mitochondrial function and energetic challenges (INTECH Open Access Publisher).
- Moberg, F., and Folke, C. (1999). Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecol. Econ.* 29, 215–233.
- Muscatine, L., and Porter, J.W. (1977). Reef Corals: Mutualistic Symbioses Adapted to Nutrient-Poor Environments. *BioScience* 27, 454–460.
- NOAA (2015) Trends in Atmospheric Carbon Dioxide - Global. National Oceanic and Atmospheric Administration. Disponível em: http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html#global_data. Acessado em 05 de dezembro de 2015
- Oakes, K.D., and Van Der Kraak, G.J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447–463.
- Odum, H.T., and Odum, E.P. (1955). Trophic Structure and Productivity of a Windward Coral Reef Community on Eniwetok Atoll. *Ecol. Monogr.* 25, 291-320.
- Pörtner, H.O., Langenbuch, M., and Reipschläger, A. (2004). Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J. Oceanogr.* 60, 705–718.
- Pörtner, H.-O., Gutowska, M., Ishimatsu, A., Lucassen, M., Melzner, F., and Seibel, B. (2011). Effects of ocean acidification on nektonic organisms. In *Ocean Acidification*, (Oxford [England]; New York: Oxford University Press), p. 154-175.
- Reipschläger, A., and Pörtner, H.-O. (1996). Metabolic depression during environmental stress: the role of extracellular versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. *J. Exp. Biol.* 199, 1801–1807.
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., and Barnes, R.D. (2005). *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva* (Sao Paulo: Roca).
- Sarmiento, V.C., Souza, T.P., Esteves, A.M., and Santos, P.J.P. (2015). Effects of seawater acidification on a coral reef meiofauna community. *Coral Reefs* 34, 955–966.
- Siddiqui, S., and Bielmyer-Fraser, G.K. (2015). Responses of the sea anemone, *Exaiptasia pallida*, to ocean acidification conditions and copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 167, 228–239.
- Starkov, A.A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 37–52.

Stat, M., Morris, E., and Gates, R.D. (2008). Functional diversity in coral–dinoflagellate symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 9256–9261.

Wäge, J., Lerebours, A., Hardege, J.D., and Rotchell, J.M. (2016). Exposure to low pH induces molecular level changes in the marine worm, *Platynereis dumerilii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *124*, 105–110.

Wilkinson, C. (2008). Status coral reef of the world:2008 (Townsville, Australia.: Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Centre).