**Processos fisiológicos envolvidos na aquisição,
perda e recolocação da zooxantela ligados ao
branqueamento de cnidários.**

**Physiological processes associated to acquisition,
loss and recovery of zooxanthellae related to
cnidarian bleaching.**

Isabel Casillas-Barragán
Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo

Essa tese é uma versão corrigida, cuja original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP.

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

Casillas-Barragán, Isabel

Processos fisiológicos envolvidos na aquisição, perda e
recolocação da zooxantela ligados ao branqueamento de
cnidários. / Isabel Casillas-Barragán; orientador Márcio
Reis Custódio. -- São Paulo, 2017.

19 f.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia.

1. Branqueamento. 2. Simbioses. 3. Estratégias de
recuperação. 4. Mecanismos preventivos de estresse
oxidativo. I. Reis Custódio, Márcio , orient. II. Título.

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

Resumo Geral

O branqueamento por estresse térmico é a principal causa do declínio de cnidários simbióticos nos oceanos tropicais. Contudo, este processo pode ser revertido. Assim, o objetivo deste trabalho é o estudo integrado dos processos fisiológico da perda e recuperação das zooxantelas relacionado ao fenômeno de branqueamento por aumento de temperatura em *E. pallida*, mediante o estudo da resposta do holobionte ao estresse térmico, com ênfase na troca de população simbiótica. Um dos mecanismos de recuperação da pigmentação investigados nesse estudo é a proliferação dos endosimbiontes remanescentes no cnidário, onde foi encontrando um padrão de repigmentação funcional em diferentes partes do pólip. Neste contexto é proposto um mecanismo de ruptura da simbiose na qual os endosimbiontes participam ativamente de sua expulsão e dispersão no meio, abrindo uma nova discussão sobre o agente diretor da simbiose. Uma vez que o branqueamento tem sido relacionado com estresse oxidativo e a fotossíntese é um processo oxidante, avaliamos a atividade redox induzida pela fotossíntese da alga hospedada, assim como a atividade antioxidante e reparadora do hospedeiro. Descobrimos no hospedeiro um mecanismo preventivo para lidar com a atividade fotossintética da zooxantela abrigada. Por outro lado, a perda da alga a partir do branqueamento pode fornecer uma oportunidade para o hospedeiro ser repopulado por outros simbiontes com diferentes capacidades fisiológicas. Assim, encontramos que existe uma troca de alga ideal para o frio (clado F), e para o calor (clado E). Entretanto, alguns clados podem estar indisponíveis no ambiente por serem termosensíveis em vida livre. Concluimos assim que, dentro dos cenários das mudanças climáticas globais, o mais vantajoso para o animal e para a alga é manter uma endopopulação mista e trocar a população simbiótica predominante segundo as condições ambientais. Aliás, encontramos que o holobionte estudado está melhor preparado para condições de aquecimento que de esfriamento. Por outro lado, considerando que o peróxido de hidrogênio é um derivado de filtros solares e que ao mesmo tempo é um precursor do branqueamento, investigamos se o branqueamento da anêmona *Anemonia sulcata* produzido pela exposição a peróxido de hidrogênio é um bom modelo como bioindicador ambiental através da avaliação da cor e de biomarcadores fisiológicos. Porém, descartamos *A. sulcata* como espécie bioindicadora por apresentar uma alta tolerância ao estresse oxidativo, provavelmente fornecido pela atividade fotossintética da alga e por ser uma espécie intermareal que suporta grandes intervalos de oxido-redução. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo apontam a relevância do *Symbiodinium* dentro da fisiologia do holobionte, tanto na recuperação do branqueamento quanto no estabelecimento e ruptura da simbiose. Consequentemente, futuros estudos podem aprimorar as técnicas de identificação dos clados

hospedados para entender a eventual sucessão endopopulacional de acordo com as condições ambientais.

Abstract

Thermal bleaching is the main cause of simbiotic cnidarian decay in tropical oceans. However, some cnidarians have shown to recover the pigmentation from such events. The main aim of this study is the holistic approach of the physiological processes associated to zooxanthela loss and recovery after thermal stress in the holobiont *E. pallida*. Firstm we considered pigmentation recovey from the remaining zooxanthelae within the cnidarian host. We found a functional pattern of pigmentation recovery. In this context, we propose a mechanism of symbiosis break in which the endosymbionts participate actively on its release and dispersion to the environment, bringing a new discussion about the role of each symbiotic partner and the driver of bleaching and recovery. Since bleaching has been related to oxidative stress and photosynthesis is an oxidizing process, we evaluated the redox activity of the host as well as the antioxidant and restorative activity, induced by photosynthesis of the hosted algae. We found in the host a preventive mechanism to deal with the photosynthetic activity of the sheltered zooxanthella. On the other hand, loss of endosymbionts from bleaching may provide an opportunity for the host to be repopulated by other symbionts with different physiological capabilities. Thus, we found that there is an ideal clade exchange for the cold (clade F), and for the heat (clade E). However, some clades may not be available in the environment because they are thermosensitive in free-living form. We conclude that, within global climate change scenarios, the most beneficial for the animal and the alga is to maintain a mixed endopopulation and to exchange the predominant symbiotic population according to environmental conditions. In fact, we found that the studied holobiont is better prepared for high than low temperatures. On the other hand, considering that hydrogen peroxide is a derivative of sunscreens and at the same time is a precursor to bleaching, we investigated whether the bleaching of anemone *Anemonia sulcata* produced by exposure to hydrogen peroxide is a good model as an environmental bioindicator through color evaluation and physiological biomarkers. However, we discard *A. sulcata* as a bioindicator species because it presents a high tolerance to oxidative stress, probably provided by algae photosynthetic activity and because it is an intertidal species that supports large oxido-reduction intervals. Thus, the results obtained in the present study point to the relevance of *Symbiodinium* within holobiont physiology, both in the recovery of bleaching and in the establishment and rupture of symbiosis. Consequently, future studies may improve the identification techniques of the host clades to understand the eventual endopopulation succession according to the environmental conditions.

Introdução geral

Branqueamento de cnidários e aspectos fisiológicos envolvidos na recuperação

Branqueamento de cnidários

O branqueamento é a perda de pigmentos em cnidários simbióticos, resultado da diminuição marcada ou do desaparecimento das zooxantelas. Este processo pode ser natural e transitório, induzido por mudanças sazonais de luz e temperatura que afetam a fisiologia da alga simbiote e/ou do animal hospedeiro (Fitt et al., 2000). No entanto, pode também ser resultado de estresse ambiental específico, como a acidificação dos oceanos, eventos de temperatura extrema (Cook et al., 1988; Porter et al., 1989; Gates, 1990; Glyn, 1990; Hoegh-Guldberg et al., 2007), ou ainda da ação indireta de microorganismos (p.ex. bactérias - Rosenberg *et al.* 2007). Dentre esses, o estresse térmico tem sido considerado como a principal causa do grave declínio de cnidários simbióticos nos oceanos tropicais verificado em tempos recentes (Hughes et al., 2003; Carpenter et al., 2008). Em nível celular, a perda das zooxantelas pode ser efetivado por diferentes mecanismos, como digestão, exocitose ou necrose, mas estudos recentes indicam a apoptose e a autofagia como uma resposta mais específica ao estresse térmico (Dunn et al., 2007).

A diminuição da população endossimbiótica (Jones et al., 2000; Grottoli et al., 2004), junto com a redução da eficiência fotossintética dos endossimbiontes remanescentes (Iglesias-Prieto et al., 1992; Lesser, 1996) podem afetar a capacidade fotossintética do holobionte, que é o hospedeiro e demais organismos que vivem em simbiose. Assim, cnidários branqueados perdem sua principal fonte de energia, alterando seu balanço energético (Muscatine, 1967, 1980) o que pode resultar em inanição (Muscatine, 1990; Anthony e Fabricius, 2000) provocando perda de biomassa (Fitt et al., 2000). Consequentemente, o hospedeiro sofre redução das taxas de crescimento, calcificação (no caso de cnidários calcificantes) e reprodução, além de ter incrementada sua vulnerabilidade frente a enfermidades (Buddemeier et al., 2004; Hughes et al., 2007; Rosenberg et al., 2007; Brandt et al., 2009), o que pode levar à morte (Brown, 1997; Hoegh-Guldberg, 1999). Cnidários afetados se tornam competidores menos eficientes em comparação com outros organismos bentônicos (Foster et al., 2008; Green et al., 2008) e, consequentemente, a comunidade associada pode sofrer mudanças dramáticas, induzindo eventos de mortalidade massiva e perda da biodiversidade local (Goreau, 1992; Hale et al., 2011).

Recuperação do branqueamento

Contudo, o processo de branqueamento pode ser revertido, e diversos cnidários têm demonstrado capacidade de recuperação da pigmentação após eventos de branqueamento (Berkelmans et al., 2006; Burt et al., 2008; Jones et al., 2008). Entretanto, previsões sobre fenômenos potencialmente deflagradores de branqueamento apontam para um aumento em frequências e severidade (Hoegh-Guldberg, 1999), o que deve agravar os efeitos dessas perturbações. Assim, impactos crônicos podem ser esperados no caso de cnidários incapazes de recuperar a pigmentação no intervalo de tempo compreendido entre sucessivos eventos de branqueamento, particularmente em áreas de recife (Baker, 2008). Se o tempo necessário para re-pigmentação for maior que o intervalo entre os eventos, a recuperação pode ser comprometida, resultando em maiores taxas de mortalidade (Jones, 2008). Nesse contexto, é relevante estudar o tempo necessário para restauração da pigmentação como uma ferramenta para avaliar os danos de futuros eventos sucessivos deflagradores de branqueamento, assim como os padrões de re-pigmentação em cnidários. Desta forma, o segundo capítulo é dedicado a investigar estes aspectos e entender os padrões de recuperação da pigmentação no plano corporal do holobionte a partir da proliferação de endossimbiontes remanescentes.

Estresse oxidativo associado ao branqueamento

O mecanismo celular do branqueamento em cnidários ainda não é bem conhecido. Diversos estudos apontam que o processo do branqueamento teria sua origem na alga hospedada. Uma vez que um agente externo estressa o holobionte, a alga produziria um excesso de espécies reativas de oxigênio que seriam trasladadas por sua vez ao hospedeiro (Neill et al., 2002; Asada, 2006; Lesser, 2006; Wong et al., 2010). Uma vez ultrapassada a capacidade redutora do hospedeiro, o mesmo poderia sofrer estresse oxidativo que ativaria mecanismos de ruptura da relação, resultando na diminuição da população endossimbiótica e o consequente branqueamento do cnidário. Para entender o estresse oxidativo sofrido pelo hospedeiro, é interessante estudar a capacidade antioxidante de defesa do mesmo. A primeira defesa antioxidante de natureza enzimática seria constituída pela catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). A glutathione entraria em um ciclo redox pela glutathione reductase (GR), enquanto a glutathione peroxidase, contribuiria com a redução da glutathione. Quando funcionando em equilíbrio, esta detoxificação é efetiva. Porém quando a produção de espécies reativas é superior ao ritmo de detoxificação, pode ocorrer dano oxidativo sobre lipídios, proteínas e material genético, danificando membranas e organelas celulares. Esse dano oxidativo ao hospedeiro, oriundo da fisiologia da alga hospedada a partir da atividade oxidante “extra”, poderia ser o ativador dos mecanismos de branqueamento (Figura 1).

Preparação fisiológica para o estresse oxidativo

De forma geral, existem mecanismos antioxidantes de antecipação ao estresse oxidativo provocado por diversos fatores cíclicos (Malik e Storey, 2009; Weihe et al., 2010; Storey e Storey, 2013; Krivoruchko e Storey, 2015). Estes têm sido descritos para uma variedade de organismos (Fu et al., 2012; Schülke et al., 2012; Klanian, 2013; Zhang et al., 2015), incluindo cnidários aposimbióticos (Teixeira et al., 2013). Em organismos fotossintéticos, grande parte dos processos fisiológicos e comportamentais estão relacionados com os ciclos físicos diurnos relacionados com a exposição à luz (Kühl et al., 1995; Yacobovitch et al., 2004; Hernando, 2016; Millar, 2016). Esses mecanismos preventivos do estresse são denominados POS, do inglês "Preparation for Oxidative Stress" (Moreira et al., 2016). Porém, POS em animais simbióticos, não é conhecido. Nesse sentido, o terceiro capítulo da presente tese visa elucidar a sincronização metabólica entre a atividade fotossintética da alga hospedada e a atividade antioxidante da anêmona no contexto do POS.

Branqueamento como estratégia adaptativa

A perda da alga pode fornecer uma oportunidade para o hospedeiro ser reinfectado por novos simbiossiontes, sendo que diversos autores o consideram como uma fase de adaptação e recuperação às novas condições ambientais (Buddemeier e Fautin, 1993; Baker 2001; Baker et al., 2004; Obura, 2009). Por exemplo, no Panamá e Galápagos o evento do "El Niño" 1982-83 provocou branqueamento e mortalidade significativamente maiores do que o "El Niño" 1997-98, embora o último tenha sido tão forte ou mais que o anterior (Podestá e Glynn, 2001). Na Grande Barreira de Corais os limites de temperatura de branqueamento aumentaram em 2002 com relação a 1998, provavelmente por um processo de aclimação (Berkelmans, 2009). Neste sentido, Baker (2001) defende que os corais branqueiam para sobreviver à alteração, ou seja, descartam ativamente suas zooxantelas. No entanto, outros consideram que o branqueamento pode ser um mecanismo para minimizar o desequilíbrio na relação hospedeiro-simbionte causado pelo estresse (Obura, 2009).

***Symbiodinium* spp.**

Atualmente, nove clados de simbiossiontes pertencentes ao gênero *Symbiodinium* são descritos na literatura, sendo nomeados de A até I (Pochon e Gates 2010). Porém, a classificação desse gênero continua em andamento, com a subdivisão de cada clado em "subclados" com base na comparação de sequências nucleotídicas da região do gene ITS2 rDNA (LaJeunesse 2001; Baker, 2003; Coffroth e Santos 2005; Sampayo et al., 2009; Finney et al., 2010; LaJeunesse e Thornhill, 2011). Dos clados/subclados conhecidos, alguns têm exibido capacidades fisiológicas distintas. Por exemplo, nem todas as linhagens de *Symbiodinium*

respondem de maneira igual ao stress térmico (Suggett et al., 2008). Em particular, os clados A e F têm sido descritos como moderadamente tolerantes, enquanto que o B seria mais sensível (McGinty et al., 2012).

O estabelecimento da simbiose

Estima-se que o 85% dos corais adquiram os dinoflagelados por via horizontal nas primeiras fases de seu ciclo de vida, durante a alimentação mediante ingestão ou fagocitose. Uma vez dentro do hospedeiro, os simbiossitos residem em vacúolos das células da gastroderme dos pólipos adultos, sendo que a maioria dos corais adultos abriga apenas um clado de simbiossitos (Baker, 2003). Por exemplo, em Scleractinia é comum encontrar associações com os clados A, B, C ou D, e mais raramente com os clados F ou G (Baker, 2003; LaJeunesse et al., 2010). Porém, a especificidade entre clado hospedado-hospedeiro é variável: enquanto algumas espécies têm sido observadas associadas com um único clado, outras podem abrigar vários tipos de *Symbiodinium* spp. (Pochon et al., 2001). Esta associação pode ser correlacionada com condições ambientais, como incidência de luz ou temperatura (LaJeunesse, 2002; Baker 2003; Finney et al., 2010), e a estrutura das populações simbióticas pode ser trocada em resposta às necessidades fisiológicas provocadas por mudanças ambientais (Baker e Romanski, 2007). Por exemplo, no caso da anêmona *Condylactis gigantea* encontrou-se uma variação da população endossimbiótica de acordo com a posição em relação à costa e com as variações sazonais de temperatura. Neste organismo, o clado A era o predominante nos ambientes mais variáveis e com picos de temperatura mais pronunciados, enquanto o B predominava em áreas de condições mais estáveis. Além disso, foi verificado que o clado B era mais susceptível ao branqueamento que o A (Venn et al., 2008).

A capacidade de trocar a população endossimbiótica segundo as condições ambientais tem sido descrita como "symbiont shuffling", ou "mudança de simbiossitos" (Baker, 2001; Chen et al., 2005). Porém, alguns cnidários branqueados, adquirem do ambiente um clado distinto daquele que estava previamente associado. Essa troca de população endossimbiótica é denominada "symbiont switching" (Baker, 2003). Num contexto de mudanças climáticas globais, se a origem do dinoflagelado é o ambiente, o cnidário tem a chance de se associar com um clado mais adaptado às condições alteradas, resultando em uma associação que pode ser mais termorresistente e que consegue se aclimatar melhor. Portanto, o branqueamento pode fornecer uma oportunidade para o hospedeiro ser "reinfectado" por clados de *Symbiodinium* mais adequados nessas condições (Buddemeier e Fautin, 1993). Sendo assim, prevê-se que as espécies com tais mecanismos podem apresentar branqueamento como uma estratégia adaptativa e, portanto, uma mortalidade menor após o episódio de stress térmico (Obura, 2009). Assim, no quarto capítulo deste trabalho exploramos a hipótese de que existe uma associação

mais apropriada para cada temperatura, e investigamos as vantagens fisiológicas de cada associação estabelecida.

As anêmonas como espécies bioindicadoras

O peróxido de hidrogênio é um precursor do branqueamento no nível intracelular (Smith et al., 2005; Sandeman, 2006). Este composto tem elevado potencial oxidativo, é difundido facilmente através das membranas orgânicas e interfere em várias reações celulares (revisado por Lesser, 2006). Além disso, pode originar o radical hidroxila (Haber e Weiss, 1934), um precursor que, por sua vez, desencadeia reações em cascata cujo término pode ser peroxidação lipídica, desnaturação proteica e dano ao DNA (Borg e Schaich, 1984; Lesser, 2006). Além disso, o peróxido de hidrogênio tem sido identificado, dentre outras substâncias oxidativas reativas, como um subproduto de reações fotocatalíticas dos filtros solares quando em contato com a água (Inbaraj et al., 2002; Hanson et al., 2006; Sánchez-Quiles e Tovar-Sánchez, 2014). A exposição a filtros solares tem sido ligada a eventos de branqueamento de cnidários (Danovaro et al., 2008) e o peróxido de hidrogênio da sua decomposição tem sido mostrado como nocivo para o fitoplâncton e outros organismos (Sánchez-Quiles e Tovar-Sánchez, 2014). Porém, os efeitos das concentrações ambientais em anêmonas têm sido pouco estudados (Mitchellmore et al., 2004; Higuchi et al., 2008). Assim, no quinto capítulo da presente tese, foi investigada a possibilidade de usar o branqueamento de anêmonas como um indicador ambiental de estresse oxidativo.

O sistema holobionte: *Exaiptasia pallida*-*Symbiodinium* spp.

Para entender estes mecanismos de recuperação do branqueamento, as interações redox entre hospedeiro-hospedado, a sincronização metabólica do holobionte e as capacidades fisiológicas das diferentes associações, é importante conhecer a relação alga-cnidário. Nesse trabalho usamos o escopo de holobionte, no qual consideramos a associação como uma única unidade funcional. Para isso, foi utilizado o holobionte formado pela anêmona *Exaiptasia pallida* (Anthozoa: Aiptasiidae) e o dinoflagelado *Symbiodinium* spp. Esta anêmona é uma espécie descrita como cosmopolita, com ampla distribuição e de associação simbiótica generalista (Grajales e Rodríguez, 2016), sendo inclusive considerada como uma peste em aquários. Em adição, devido a facilidade de manipulação e cultivo em laboratório, tem sido usada como modelo em estudos sobre o branqueamento de corais (Thornhill et al., 2013; Baumgarten et al., 2015). Sua transparência na forma aposimbiótica permite acompanhar com facilidade a repopulação endosimbiótica durante a recuperação da pigmentação. Adicionalmente, sendo solitária, facilita o desenho experimental em comparação com cnidários coloniais, e por não possuir esqueleto permite isolar melhor as relações metabólicas, sem interferência dos processos calcificantes.

Objetivos gerais do estudo

Propomos um estudo integrado sobre o branqueamento de cnidários e sua recuperação, considerando as interações entre o cnidário hospedeiro e a zooxantela hospedada. O objetivo geral é o estudo do processo fisiológico da perda e realojamento do simbiote relacionando ao fenômeno do branqueamento em *E. pallida* por aumento de temperatura. Os objetivos específicos da proposta são:

- a) Estudo da repopulação endosimbiótica após eventos de branqueamento/estresse termal;
- b) Pesquisa das interações redox hospedeiro-hospedado;
- c) Avaliação da variação de parâmetros fisiológicos em função da temperatura e do tipo de alga oferecida;
- d) Proposta de um modelo de anêmona como bioindicador ambiental.

Para responder aos objetivos foram desenvolvidos diversos protocolos, desde cultivo e manutenção de organismos, até microscopia eletrônica e técnicas micro-espectrofotométricas, para serem utilizadas neste modelo (*E. pallida*), os quais são descritos nos capítulos pertinentes.

Figura 1. Mecanismo celular de branqueamento em cnidários.

Conclusões e considerações finais

Branqueamento adaptativo em cnidários

Este estudo coloca evidências em direção a hipótese de branqueamento adaptativo, que observa o branqueamento como uma fase de aclimação às novas condições ambientais. Esse processo adaptativo pode acontecer dentro da plasticidade da relação simbiótica entre os parceiros que conformam o holobionte. Para isso exploramos diferentes vias de recuperação do branqueamento, desde a proliferação dos endosimbiontes remanescentes no holobionte branqueado até a troca do dinoflagelado simbiote disponível no ambiente, assim como o tempo necessário para restauração da pigmentação. Estabelecemos o relacionamento redox entre os parceiros simbiotes com base na fotossíntese. Discutimos sobre as vantagens de diferentes clados de *Symbiodinium* para estabelecer simbiose ou permanecer em vida livre segundo os cenários de temperatura, assim como as vantagens para o cnidário hospedar populações mistas de endosimbiontes e permitir sua predominância segundo as condições ambientais dentro das previsões das mudanças climáticas globais.

Recuperação do branqueamento

As vias de recuperação do branqueamento podem ser variadas e não dependem apenas do animal, mas também da alga hospedeira. Assim, apresentamos uma estratégia de recuperação do branqueamento da anêmona a partir da proliferação dos endosimbiontes remanescentes, que seguem um padrão de pigmentação funcional. Esse padrão prioriza a obtenção de recurso energético pela anêmona e garante o mesmo para a prole através da transmissão vertical do endosimbionte por reprodução assexuada (laceração pedal) do hospedeiro. Porém, essa estratégia inclui também a participação do simbiote hospedado, pois observamos a reprodução e dispersão da alga simbiote a partir do organismo hospedeiro. Assim, propomos uma estratégia de dispersão das zooxantelas, na qual utiliza o cnidário é utilizado como vetor de dispersão. Este processo se inicia com a comunicação célula – célula entre os simbiotes, continua com a união de células de vários estágios para formar uma estrutura organizada pelos flagelos das próprias microalgas e suportadas por uma película de natureza proteoglicana, a qual é finalmente, repelida pela anêmona e expulsa ao ambiente.

Preparação para o estresse oxidativo

Apesar dos benefícios metabólicos que a alga fornece para o hospedeiro, a fotossíntese é um processo oxidante. Prévios estudos têm apontado o estresse oxidativo como desencadeante

do branqueamento. Assim, nessa tese aprofundamos o conhecimento acerca da relação basal redox entre os parceiros simbiotes. Descobrimos um mecanismo do hospedeiro de antecipação ao estresse oxidativo no qual o animal se prepara para a atividade fotossintética da alga hospedada. Observamos que a atividade fotossintética da alga, paralela à oxidação da glutathione no hospedeiro, tem seu máximo ao final do período escuro, se antecipando à luz, se mantendo constante durante o período diurno e decaindo no final desse período. Encontramos mecanismos antioxidantes preventivos que começam no final do período diurno e são desenvolvidos durante o período escuro se antecipando à fotossíntese. As proteínas chaperonas mantêm um nível basal e exibem seu mínimo no final do período diurno, prévio ao mínimo fotossintético. Este mínimo fotossintético coincide com o máximo de glutathione reduzida, atuando como um possível substrato que se antecipa ao máximo de produção das espécies oxidativas reativas do hospedeiro que, por sua vez, se antecipa ao máximo fotossintético e ao período luminoso.

Estresse oxidativo e temperatura

Encontramos estresse oxidativo produzido em baixas temperaturas independentemente do clado oferecido. Assim, ao contrário do esperado, o holobionte tolera melhor os eventos de temperaturas altas se comparados com os de baixa. Em baixa temperatura, apesar de dobrar a capacidade antioxidante total do holobionte, a mesma foi insuficiente para reduzir os radicais livres. Como consequência, esses radicais induziram dano oxidativo no animal. Já em altas temperaturas, o holobionte quadruplica a capacidade antioxidante assim como o conteúdo em glutathione reduzida da anêmona, conseguindo reduzir os radicais livres e prevenindo o dano oxidativo no hospedeiro. Em particular, o clado A fornece maior capacidade antioxidante em altas temperaturas, e o hospedeiro contém mais glutathione reduzida quando comparado com a associação com os outros clados aqui considerados. Consequentemente, pode ser uma vantagem comparativa para a anêmona se associar com o clado A em episódios oxidantes por temperaturas extremas de altas temperaturas.

Associações *Exaiptasia pallida*-*Symbiodinium* spp. e temperatura

Outra vantagem comparativa para anêmona se associar com outro clado é oferecer melhoras fotossintéticas. Os clados F e E fornecem mais fotossíntese efetiva em temperaturas frias e quentes, respectivamente. Em adição, estes clados aumentam a capacidade fotossintética máxima do hospedeiro em baixas temperaturas, enquanto os clados A e D em temperaturas normais e os D, E e F em temperaturas altas. Assim, os clados E e F oferecem vantagens fotossintéticas no contexto das mudanças climáticas. Outra vantagem comparativa para o hospedeiro é se associar com clados que fornecem maior quantidade de remediação ao dano

proteico, os quais são apresentados pelos clados B, D e F, independente da temperatura. Apesar de demonstrar que a simbiose pode se estabelecer em períodos de 24 horas por transmissão horizontal, essa interação apenas será possível no caso de a alga estar disponível no ambiente e apta a se associar.

***Symbiodinium* spp. em vida livre**

Porém, os dinoflagelados podem não estar disponíveis na coluna de água, impedindo sua aquisição pelos cnidários. De acordo com as projeções de temperatura ocasionadas pelas mudanças climáticas, encontramos que a diversidade de clados no ambiente pode diminuir em favor de dinoflagelados generalistas. Clados sensíveis a mudanças em temperatura (A, B e C) podem desaparecer em cenários de frio ou de calor por falência fotossintética. Os clados D e F podem ser favorecidos pelo frio, o clado D pelo calor e o E pode tolerar o aquecimento. Assim, o clado generalista D é favorecido por qualquer mudança de temperatura. Por outro lado, a fisiologia desses clados, em vida livre, é diferente daquela quando em associação. Dependendo do cenário, pode ser que não seja vantajoso para a alga estabelecer a simbiose. Por exemplo, o clado D generalista é mais efetivo fotossinteticamente em vida livre que em simbiose, podendo evitar a simbiose em benefício próprio.

Em síntese, a associação de *E. pallida* com os clados A, E e F apresentam benefícios para a anêmona. Porém, o clado A pode estar indisponível no ambiente por ser termosensível. Seria vantajoso para a anêmona a aquisição das algas em ambientes com 24°C, onde estaria disponível, aumentando a capacidade fotossintética máxima em associação nessas condições, e a capacidade antioxidante do hospedeiro em caso de eventos de aquecimento. Porém, a alga apenas obtém benefício da associação em caso de mudança de temperatura. No cenário de esfriamento, o clado F seria favorecido em vida livre, ou seja, estaria disponível no ambiente e também seria beneficiado pela associação. O clado E toleraria o aquecimento, ou seja, estaria disponível no ambiente e seria beneficiado pela associação.

As anêmonas como espécies bioindicadoras

Dado que a capacidade fisiológica pode mudar com as algas simbiotes, as anêmonas simbióticas não são os melhores modelos para estudos ecotoxicológicos. As anêmonas não são boas espécies bioindicadoras do branqueamento por estresse oxidativo devido à sua alta tolerância. Essa alta tolerância pode ser decorrente dos mecanismos preventivos antioxidantes do animal derivados da atividade fotossintética diária da alga hospedada. Também, espécies entre marés como *A. sulcata* acometem períodos de oxidação extrema durante a maré baixa. Por isso, para futuros estudos recomendamos escolher anêmonas aposimbióticas e bentônicas

como espécies bioindicadoras. Contudo, segundo nossos resultados, poderiam ser um interessante modelo de detoxificação para estudos antioxidantes e de restauração genética e neurológica.

Consideração final

Em conclusão, todas as partes deste estudo apontam a relevância da zooxantela para a recuperação do branqueamento dos cnidários assim como seu papel decisivo no estabelecimento da simbiose. Após confirmar que diferentes clados possuem diferentes capacidades fisiológicas que mudam segundo o estilo de vida livre ou hospedado, e levando em consideração que as mudanças climáticas irão reduzir os clados disponíveis no ambiente, concluímos que o mais apropriado para os dois parceiros seria hospedar populações mistas. Hospedando populações mistas na presença de clados crípticos, a anêmona poderia trocar de população predominante de acordo com as condições ambientais, sendo que a alga seja simultaneamente beneficiada. Desta forma, a alga aumenta o espectro de temperaturas toleráveis e poderia usar o cnidário como vetor de reprodução e dispersão. Dessa maneira, é pertinente o estudo de eventuais sucessões ecológicas das endopopulações simbiontes em diferentes cenários de temperatura. Para isso, seria necessário aprimorar as técnicas genômicas de identificação como também de quantificação dos clados de *Symbiodinium*. Finalmente, em termos de conservação, apresentamos evidências de como as mudanças climáticas podem diminuir a biodiversidade e influenciar negativamente os mecanismos que garantem a persistência dos nossos ecossistemas.

Referencias

- Anthony KR, Fabricius KE. (2000) Shifting roles of heterotrophy and autotrophy in coral energetics under varying turbidity. *J Exp Mar Bio Ecol.*;252:2.
- Baker AC. (2001) Reef corals bleach to survive change. *Nature* 411:765–766.
- Baker AC. (2003) Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annu Rev Ecol, Evol Syst* 34:661-689.
- Baker AC, Glynn PW, Riegl B. (2008) Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuar Coast Shelf Sci.*;80:4.
- Baker AC, Romanski AM. (2007) Multiple symbiotic partnerships are common in scleractinian corals, but not in octocorals: comment on Goulet (2006). *Mar Ecol Prog Ser* 335:237–242.
- Baumgarten S, Simakov O, Esherick LY, Liew YJ, Lehnert, EM Michell CT, Voolstra CR. (2015) The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:38.
- Berkelmans R (2009) Bleaching and mortality thresholds: How much is too much? In: *Coral bleaching*, pp.103-119
- Berkelmans R, Van Oppen MJ. (2006) The role of zooxanthella in the thermal tolerance of corals: a ‘nugget of hope’ for coral reefs in an era of climate change. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*;273:1599.
- Borg DC and KM Schaich. (1984) Cytotoxicity from coupled redox cycling of autoxidizing xenobiotics and metals. *Israel J. Chem.* 24,38-53.
- Brown BE. (1997) Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs.*;16.
- Buddemeier RW, Baker AC, Fautin DG, Jacobs JR. The adaptive hypothesis of bleaching. In: *Coral Health and Disease*. Rosenberg E, Loya Y, editors. (2004). Springer, Berlin and other cities, p. 427-444.
- Buddemeier RW, Fautin DG. (1993) Coral bleaching as an adaptive mechanism. *Bioscience* 43:320–326.
- Burt J, Bartholomew A, Usseglio P. (2008) Recovery of corals a decade after a bleaching event in Dubai, United Arab Emirates. *Mar Biol.*;1:154-1.
- Coffroth MA and Santos SR (2005) Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist* 156:19-34.
- Cook CB, Logan A, Ward J, Luckhurst B, Berg Jr CJ. (1990) Elevated temperatures and bleaching on a high latitude coral reef: the 1988 Bermuda event. *Coral Reefs.*;9:1.
- Finney J, Pettay D, Sampayo E, Warner M, Oxenford H, LaJeunesse T. (2010) The relative significance of host–habitat, depth, and geography on the ecology, endemism, and speciation of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Microb Ecol* 60:250-263.
- Fitt WK, McFarland, FK, Warner ME, Chilcoat GC. (2000) Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnol Oceanogr* 45:3.
- Fitt WK. (2000) Cellular growth of host and symbiont in a cnidarian-zooxanthellar symbiosis. *Biol Bull.* 198:1.
- Foster NL, Box SJ, Mumby PJ. (2008) Competitive effects of macroalgae on the fecundity of the reef-building coral *Montastraea annularis*. *Mar Ecol Prog Ser.*;367.
- Fu Z, Agudelo P, Wells, CE. (2012). Induction of glutaredoxin expression in response to desiccation stress in the foliar nematode *Aphelenchoides fragariae*. *J. Nematol.* 44, 370–376.
- Gates RD. (1990) Seawater temperature and sublethal coral bleaching in Jamaica. *Coral reefs.* 8:4.
- Glynn PW, D'croz L. (1990) Experimental evidence for high temperature stress as the cause of El Nino-coincident coral mortality. *Coral Reefs.* 8:4.

- Goreau TJ. (1992) Bleaching and reef community change in Jamaica: 1951-1991. *Amer Zool.* 1992;32.
- Grajales A and Rodríguez E. (2016) Elucidating the evolutionary relationships of the Aiptasiidae, a widespread cnidarian–dinoflagellate model system (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria: Metridioidea). *Mol Phylogenet Evol.*;94.
- Grottoli AG, Rodrigues LJ, Juarez C. (2004) Lipids and stable carbon isotopes in two species of Hawaiian corals, *Porites compressa* and *Montipora verrucosa*, following a bleaching event. *Mar Biol.*;145:3.
- Guldberg O and Fitt WK. (2010) Long-standing environmental conditions, geographic
- Haber, F and J Weiss, 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc- R. Sot. London (A)* 147.332-351.
- Hanson, Kerry M, Enrico Gratton, and Christopher J Bardeen. (2006): "Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin." *Free Radical Biology and Medicine* 41.8 1205-1212.
- Hernando, CE, 2016. Transcriptional and post-transcriptional control of the plant circadian gene regulatory network. *BBA - Gene Regul. Mech.*
- Higuchi T, Fujimura H, Arakaki T and Oomori T. (2008) ‘Activities of antioxidant enzymes (SOD and CAT) in the coral *Galaxea fascicularis* against increased hydrogen peroxide concentrations in seawater’, (19), pp. 7–11.
- Hoegh-Guldberg O. (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshwat Res.* 50.
- Hughes TP, Rodrigues MJ, Bellwood DR, Ceccarelli D, Hoegh-Guldberg O, McCook L, Moltschaniwskyj N, Pratchett MS, Steneck RS, Willis B. (2007) Phase shifts, herbivory, and the resilience of coral reefs to climate change. *Curr Biol.* ;17:4.
- Iglesias-Prieto R, Matta JL, Robins, WA, Trench RK. (1992) Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 89:21.
- Inbaraj, J. Johnson, Piotr Bilski, and Colin F. Chignell. (2002): "Photophysical and Photochemical Studies of 2-Phenylbenzimidazole and UVB Sunscreen 2-Phenylbenzimidazole-5-sulfonic Acid." *Photochemistry and photobiology.* 75.2 107-116.
- Jones AM, Berkelmans R, Van Oppen, MJ, Mieog JC, Sinclair W. (2008) A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*;275:1641.
- Jones R. (2008) Coral bleaching, bleaching-induced mortality, and the adaptive significance of the bleaching response. *Mar Biol.*;154:1.
- Jones RJ, Ward S, Amri AY, Hoegh-Guldberg O. (2000) Changes in quantum efficiency of Photosystem II of symbiotic dinoflagellates of corals after heat stress, and of bleached corals sampled after the 1998 Great Barrier Reef mass bleaching event. *Mar Freshwater Res.* ;51:1.
- Klanian, M.G., (2013). Physiological and immunological conditions of the sea cucumber *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867) during dormancy. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 444, 31–37.
- Krivoruchko, A., Storey, K.B., (2015). Turtle anoxia tolerance: biochemistry and gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1188–1196.
- Kühl, M, Cohen, Y., Dalsgaard, T., Jorgensen, B. B., Revsbech, N. P. (1995). Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleractinian corals studied pH and light with microsensors for O₂ , 117, 159–172.
- LaJeunesse TC (2001) Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: In search of a "species" level marker. *J Phycol* 37:866-880.
- LaJeunesse TC (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Mar Biol* 141:387-400.
- LaJeunesse TC, Pettay DT, Sampayo EM, Phongsuwan N, Brown B, Obura DO, Hoegh-Guldberg O, Fitt WK (2010) Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host–symbiont

- specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *J Biogeogr* 37:785-800
- LaJeunesse TC, Thornhill DJ. (2011) Improved resolution of reef-coral endosymbiont *Symbiodinium* species diversity, ecology, and evolution through *psbA* non-coding region genotyping. *PLoS ONE* 6:e29013
- Lesser MP. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol Oceanogr.* 1996;41:2.
- Lesser MP (2006) 'Oxidative Stress In Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology', *Annual Review of Physiology*, 68(1), pp. 253–278.
- Malik AI and Storey KB. (2009) Activation of antioxidant defense during dehydration stress in the African clawed frog. *Gene* 442, 99–107.
- McGinty ES, Pieczonka J, and Mydlarz LD. (2012) Variations in reactive oxygen release and antioxidant activity in multiple *Symbiodinium* types in response to elevated temperature. *Microbial ecology*, 64(4), 1000-1007.
- Millar AJ. (2016) The Intracellular Dynamics of Circadian Clocks Reach for the Light of Ecology and Evolution. *Annual review of plant biology*. 29;67:595-618.
- Mitchelmore CL and Hyatt S. (2004) Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Marine environmental research*, 58(2), 707-711.
- Moreira DC, Venancio, LPR, Sabino, M aCT, Hermes-Lima M. (2016) How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 200, 64–78.
- Muscatine L. (1967) Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. *Science.* ;156:3774.
- Muscatine L. (1990) The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Ecosystems of the World.*;25.
- Muscatine L. Uptake, retention, and release of dissolved inorganic nutrients by marine alga-invertebrate associations. In: Cook CB, Pappas PW, Rudolph ED, editors. *Cellular interactions in symbiosis and parasitism*. Ohio State University Press, Columbus; 1980. p. 229-244.
- Obura DO. (2009) Reef corals bleach to resist stress. *Bull Mar Poll* 58:206–212.
- Pochon X and Gates RD. (2010) A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:492-497.
- Pochon, X, Pawlowski J, Zaninetti L and Rowan R. (2001) High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Mar. Biol.*, 139:1069-1078.
- Podestá GP and Glynn PW. (2001) The 1997-98 El Niño event in Panamá and Galápagos: an update of thermal stress indices relative to coral bleaching. *Bull Mar Sci* 69:43–59.
- Porter JW, Fitt WK, Spero HJ, Rogers CS, White MW. (1989) Bleaching in reef corals: physiological and stable isotopic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;86:23.
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Rev Microbiol.* ;5:5.
- Sampayo EM, Dove S, Lajeunesse TC (2009) Cohesive molecular genetic data delineate species diversity in the dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Mol Ecol* 18:500-519.
- Sánchez-Quiles, D and Tovar-Sánchez A. (2014). Sunscreens as a source of hydrogen peroxide production in coastal waters. *Environmental science & technology*, 48(16), pp.9037-9042.
- Sandeman IM. (2006) 'Fragmentation of the gastrodermis and detachment of zooxanthellae in symbiotic cnidarians : a role for hydrogen peroxide and Ca²⁺ in coral bleaching and algal density control', *Revista de Biolog Tropical*. Universidad de Costa Rica, 54(December), pp. 79–96.
- Schülke S, Dreidax D, Malik A, Burmester T, Nevo E, Band M, Avivi A, Hankeln T, (2012). Living with stress: regulation of antioxidant defense genes in the subterranean, hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax*. *Gene* 500, 199–206.
- Smith DJ, Suggett DJ and Baker AC. (2005) 'Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis

- the primary cause of thermal bleaching in corals?', *Global Change Biology*, 11, pp. 1–11.
- Storey KB, Storey JM. (2013). Molecular biology of freezing tolerance. *Compr. Physiol.* 3, 1283–1308.
- Suggett DJ, Smith DJ, Davey P, Hennige S Baker NR. (2008) Photosynthesis and production of hydrogen peroxide by *Symbiodinium* (Pyrrophyta) phylotypes with different thermal tolerances. *J Phycol* 44: 948–956.
- Teixeira T, Diniz M, Calado R, Rosa R (2013). Coral physiological adaptations to air exposure: heat shock and oxidative stress responses in *Veretillum cynomorium*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 439, 35–41.
- Thornhill DJ, Xiang Y, Pettay DT, Zhong M, Santos SR. (2013). Population genetic data of a model symbiotic cnidarian system reveal remarkable symbiotic specificity and vectored introductions across ocean basins. *Mol Ecol.*;22:17.
- Venn AJ, Loram H, Trapido-Rosenthal D Joyce and Douglas A. (2008) Importance of time and place: Patterns in abundance of *Symbiodinium* Clades A and B in the tropical sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biol. Bull.*, 215:243-252.
- Weihe E, Kriews M, Abele D (2010). Differences in heavy metal concentrations and in the response of the antioxidant system to hypoxia and air exposure in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. *Mar. Environ. Res.* 69, 127–135.
- Yacobovitch T, Benayahu Y, Weis VM. (2004). Motility of zooxanthellae isolated from the Red Sea soft coral *Heteroxenia fuscescens* (Cnidaria). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 298, 35–48.
- Zhang Y, Liang S, He J, Bai Y, Niu Y, Tang X, Li D, Chen Q. (2015) Oxidative stress and antioxidant status in a lizard *Phrynocephalus vlangalii* at different altitudes or acclimated to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 190, 9–14.
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5:388-395
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391-396
- Wong CM, Marcocci L, Liu LL, Suzuki YJ (2010) Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling* 12:393-404
- Green DH, Edmunds PJ, Carpenter RC (2008) Increasing relative abundance of *Porites astreoides* on Caribbean reefs mediated by an overall decline in coral cover. *Marine Ecology-Progress Series* 359:1-10
- Hale R, Calosi P, McNeill L, Mieszkowska N, Widdicombe S (2011) Predicted levels of future ocean acidification and temperature rise could alter community structure and biodiversity in marine benthic communities. *Oikos* 120:661-674
- Chen CA, Wang J-T, Fang L-S, Yang Y-W (2005) Fluctuating algal symbiont communities in *Acropora palifera* (Scleractinia: Acroporidae) from Taiwan. *Mar Ecol Prog Ser* 295:113-121
- Carpenter KE, Abrar M, Aeby G, Aronson RB, Banks S, Bruckner A, Chiriboga A, Cortes J, Delbeek JC, DeVantier L, Edgar GJ, Edwards AJ, Fenner D, Guzman HM, Hoeksema BW, Hodgson G, Johan O, Licuanan WY, Livingstone SR, Lovell ER, Moore JA, Obura DO, Ochavillo D, Polidoro BA, Precht WF, Quibilan MC, Reboton C, Richards ZT, Rogers AD, Sanciangco J, Sheppard A, Sheppard C, Smith J, Stuart S, Turak E, Veron JEN, Wallace C, Weil E, Wood E (2008) One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science* 321:560-563
- Brandt ME, McManus JW (2009) Disease incidence is related to bleaching extent in reefbuilding corals. *Ecology* 90:2859-2867
- Baker AC, Starger CJ, McClanahan TR, Glynn PW (2004) Corals' adaptive response to climate change. *Nature* 430:741-741
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A, Hatziolos ME (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318:1737-1742