

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Respostas fisiológicas do cavalo-marinho tropical, *Hippocampus reidi*, à
acidificação e aquecimento dos oceanos**

Cláudia Raquel Fernandes Pereira

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação orientada por:

Doutora Marta Pimentel

Professor Doutor Rui Rosa

2019

Mar, metade da minha alma é feita de maresia

Pois é pela inquietação e nostalgia,

Que há no vasto clamor da maré cheia,

Que nunca nenhum bem satisfaz.

E é porque as tuas ondas desfeitas pela areia

Mais fortes se levantam outra vez,

Que após cada queda caminho para a vida,

Por uma nova ilusão entontecida.

Sophia de Mello Breyner

Agradecimentos

Se alguém me dissesse há 15 anos que estaria onde estou hoje, eu não acreditaria. Mesmo hoje me pergunto se aquela menina que vivia no campo abdicaria de tudo aquilo para ir à procura de um sonho. Mas ela abdicou.

À medida que fui devorando os pequenos documentários que iam passando na tv, fui-me apaixonando pelo mar com tanto para descobrir. Onde animais fantásticos viviam e que precisavam de alguém para os estudar e os proteger, e eu queria ser essa pessoa. Lembro-me de os meus pais me dizerem que talvez não seria a melhor área porque não teria emprego ali pela região, mas, como costumo dizer, “quem corre por gosto não cansa” e assim foi e é, porque ainda não cansei.

À minha avó, que apesar de analfabeta soube acompanhar a modernização do mundo. Por todos os valores que me transmitiu e pelo amor à cozinha que me impregnou. Nunca me viu a levantar o canudo, mas eu sei que está orgulhosa no caminho que escolhi.

Aos meus pais, pela educação fantástica e feliz que tive. Sou uma sortuda. Sem vocês eu não seria a pessoa que sou hoje, nem estaria onde estou hoje. Obrigada por me fazerem feliz e por nunca me deixarem duvidar do meu trabalho.

À minha irmã, o melhor presente que os meus pais me poderiam ter dado, que me acompanhou nesta insanidade e já sabe o que lhe espera nos próximos 2 anos. Por ser a melhor psicóloga nos meus maus dias e por me acompanhar neste sonho.

Ao meu namorado, companheiro e amor de uma vida. Ao meu porto seguro. Que me fez acreditar que poderia vir para Lisboa para o mestrado que eu ambicionava. Por acreditar em mim, por mais que eu duvide. Por me ajudar a manter a sanidade nestes 3 anos. Por ser o meu pilar ao longo desta etapa, tão longe das minhas origens. Por todo o amor e por toda aquela que ainda está para vir, “I’m a lucky girl”.

À SPEA, pelo estágio espetacular na Berlenga. Por me ajudarem a compreender o que realmente eu queria para o meu futuro como bióloga marinha. Por me entusiasmar pela conservação desde o primeiro dia que pisei a ilha.

Um especial agradecimento ao Rui e à Marta, por tornarem possível o meu sonho de trabalhar com cavalos-marinhos. A ciência é sempre imprevisível, obstáculos surgiram, mas deu-se a volta e aqui está o resultado. Muito obrigado. A todas as pessoas que conheci neste ambiente de investigação e que me transmitiram um pouquinho do seu conhecimento, em especial à Catarina, ao Cyrne e à Kuka por disporem um pouco do seu tempo em mim e no plano A. Aos amigos que ganhei nesta aventura, o Grilo, a Cátia e a Rita, por toda as gargalhadas, aprendizagens e jantaras.

Quero agradecer à Dra. Filipa Faleiro por me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar com cavalos-marinhos, nomeadamente a espécie *Hippocampus reidi*. Estendo este agradecimento ao António Gomes e à empresa *Lusoreef* por terem sido a casa para estes animais até chegarem a mim.

À faculdade de Ciências e Tecnologia da Caparica, em concreto ao Doutor Mário Diniz, por me ter recebido e dado a oportunidade de desenvolver o trabalho prático desta dissertação.

Aos meus colegas de mestrado, por todas os jogos de tabuleiro, conversas e partilha de ideias.

À minha amiga nortenha que conheci na capital. Óbvio que quando se juntam duas nortenhas, há algazarra da boa. Amiga, obrigadão por toda a ajuda incondicional, por todas as conversas, por todas as partilhas, ansiedades e aventuras. Por seres mesmo aquela amiga nos bons e maus momentos. Como tu o dizes vamos continuar neste barco juntas por mais aventuras pelo mar fora.

Com estes 27 anos de aprendizagem, posso dizer que o que aprendemos no papel nem sempre é possível transpor para a realidade. Nos dias de hoje, e sendo a chata do ambiente, temos muito por fazer neste planeta e pelas pessoas. Num planeta que nos dá tanto, temos que começar a retribuir essa dádiva. Porque a vida é de sonhos, este é o meu e muitos outros virão.

Abstract

Climate change derives from the increasing concentration of greenhouse gases. These gases are increasing mainly from human activities, such as the burning of fossil fuels. These changes in the environment lead to chemical and physical changes in the world oceans, such as the rising temperatures, ocean acidification, melting of the ice caps, rising sea levels, frequency of drastic weather events, etc. These modifications set off changes within biotic communities, which may undermine the survival of many of them.

The increasing concentrations of greenhouse gases lead to a rise in temperature, and an increase of 1.1 to 6.4°C expected by the end of the century. This increment in atmospheric temperature can also be observed in the ocean. These temperature changes in the aquatic environment generate physiological, behavioral and phenological changes that jeopardize the survival of communities. As fish are ectothermic, their internal temperature varies depending on the outside. Although animals may have some resilience acclimating their temperature to a range of temperatures near their optimum, when exposure subjected to a continuous extreme value, the risk of mortality increases, fitness is reduced, and populations decline or run the risk of extinction. Alongside with temperature increase, there is also the increase in CO₂, which in turn decreases the pH of ocean water.

Since the industrial revolution there has been a rise in the atmospheric CO₂, and it is expected to continue to rise until the next century (1000 ppm by 2100). As the oceans function as carbon sinks, they absorb atmospheric CO₂, which increases the partial pressure of CO₂, lowering the pH. This continued retention of CO₂ lead to a decrease of 0.10 pH units from 8.21 to 8.10, a process known as ocean acidification. When CO₂ reacts with seawater it triggers a series of reactions that lead to the formation of carbonic acid (H₂CO₃), the increase of bicarbonate ions (HCO₃⁻), the reduction of carbonate ions (CO₃²⁻) which in turn results in lower calcium carbonate (CaCO₃) levels, the latter being a constituent of calcifying organisms. Decreasing levels of CaCO₃ creates a chemical imbalance of water affecting the organisms with carbonate structures and other biological and chemical processes.

For organisms living in an aerobic environment, the increase the production of the reactive oxygen species, ROS, is inevitable. As in any other environment, ROS production varies depending on environmental gradients such as temperature and pH. Organisms when exposed to environmental stress, ROS production increase, producing oxidative stress. In order to compensate for this production, the organisms possess several antioxidant defences, such as thermal shock proteins (HSPs), ubiquitins and antioxidant enzymes. When this defense is not able to eliminate oxidative damage, can occur cellular damage, such DNA damage and lipid peroxidation.

The Long-snout Seahorse (*Hippocampus reidi*) is a tropical seahorse that inhabits coastal areas, spreading along the western Atlantic Ocean. These fish are often found in mangroves, seagrass, and other habitat types (even artificial ones). Due to their poor swimming capacity, these animals live anchored to these structures (such as seagrass or macroalgae) so that they are not carried away with the current. These animals are solitary, but are often spotted in pairs, as they are characteristic of being monogamous. The ecology of these animals makes them vulnerable to habitat change often due to overfishing. The increasing temperature of the oceans

leads many species to look for more favourable places to settle. However, these fish don't migrate due to their poor mobility. In addition, climate change and pollution destroy their habitat, making it impossible their survival. The high temperatures experienced in a mesocosms showed that adult seahorses have temperature resilience, but don't support the combined effect of rising temperatures and pH decrease. This observation might not be true for juveniles, who may have less buffering capacities than adults to endure climate change. In addition to these juveniles experiencing a high life mortality, survival success with climate change is further diminished. The monitoring of these populations is essential in order to have a clear precision of the dynamics of these populations. In this way it is possible to implement concise measures, such as marine protected areas so that not only the species can survive and thrive, such as its habitat and surrounding community.

Keywords: ocean warming, ocean acidification, oxidative *stress*, *Hippocampus reidi*

Resumo

As alterações climáticas resultam maioritariamente do aumento dos gases de efeito de estufa. Estes gases provêm principalmente das atividades humanas, como por exemplo, a queima de combustíveis fósseis. Esta alteração no ambiente resulta em alterações químicas e físicas nos oceanos, tais como o aumento da temperatura, acidificação dos oceanos, degelo, aumento do nível médio dos oceanos, a ocorrência de eventos climáticos drásticos e extremos, etc. Estas alterações conduzem a mudanças dentro das comunidades o que pode pôr em causa a sobrevivência de muitas delas.

As crescentes concentrações dos gases de efeito de estufa levam ao aumento da temperatura, sendo espetável o aumento de 1,1 a 6,4°C até ao final do século. Este aumento da temperatura atmosférica resulta igualmente num aumento da temperatura dos oceanos. Estas alterações de temperatura no meio aquático resulta em alterações fisiológicas, comportamentais, fenológicas que põem em causa a sobrevivência de muitas comunidades. Como os peixes são ectotérmicos, a sua temperatura interna varia consoante a exterior. Apesar dos animais possuírem alguma resiliência, aclimatando a sua temperatura a uma série de temperaturas próximas da sua ótima, quando a exposição é contínua e o valor é ultrapassado, o risco de mortalidade aumenta, o *fitness* é reduzido, e as populações declinam ou correm o risco de extinção. Aliado ao aumento de temperatura encontra-se o aumento de CO₂ que por sua vez diminui o pH da água.

Desde a revolução industrial que se verifica o aumento de CO₂ atmosférico sendo espetável o contínuo aumento deste até ao próximo século, 1000 ppm até 2100. Como os oceanos funcionam como reservatórios de carbono, estes absorvem grande parte do CO₂ atmosférico, o que aumenta a pressão parcial de CO₂ e diminuindo o pH. Esta contínua retenção de CO₂ provocou uma diminuição de 0,10 unidades de pH, de 8,21 para 8,10, processo designa-se por acidificação dos oceanos. Quando o CO₂ reage com a água do mar desencadeia uma série de reações químicas que leva à formação de ácido carbónico (H₂CO₃), ao aumento de iões de bicarbonato (HCO₃⁻), a redução de iões de carbonato (CO₃²⁻), que resulta na diminuição dos níveis de carbonato de cálcio (CaCO₃), sendo este último um dos constituintes principais dos organismos calcificadores. Esta diminuição dos níveis de CaCO₃ não só afeta os organismos que formam estruturas calcárias, como afeta outros processos biológicos e químicos, dado que existe um desequilíbrio químico da água.

Para os organismos que vivem num ambiente aeróbio, a produção de espécies reativas de oxigénio, ROS, é inevitável. Como em qualquer outro ambiente, a produção de ROS varia consoante gradientes ambientais, tais como a temperatura e pH. Os organismos quando expostos a *stress* ambiental, a produção de ROS aumenta, produzindo *stress* oxidativo. De forma a compensar esta produção, os organismos possuem diversas defesas antioxidantes, tais como a produção de proteínas de choque térmico (HSPs), as ubiquitinas e uma série de enzimas antioxidantes. Quando esta defesa não é capaz de eliminar o dano oxidativo pode ocorrer dano celular, tal como, dano de ADN e a peroxidação lipídica.

O cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, é um cavalo-marinho tropical que habita nas zonas costeiras, distribuindo-se ao longo do oceano Atlântico ocidental. Estes peixes são encontrados frequentemente em mangais, pradarias marinhas, entre outros tipos de habitat (até mesmo artificiais). Devido à sua fraca natação, estes animais encontram-se normalmente ancorados a algum substrato, tal como ervas marinhas ou macroalgas,

de forma a que não sejam levados com a corrente. Estes animais são solitários, mas muitas das vezes são avistados aos pares, uma vez que são organismos monogâmicos. A ecologia destes animais torna-os vulneráveis às alterações do seu habitat, tal como à sobrepesca. Com o aquecimento dos oceanos muitas espécies procuram locais mais favoráveis ao seu estabelecimento, o mesmo não se sucede com estes peixes, devido à sua fraca mobilidade e capacidade natatória. Para além disto, as alterações climáticas e poluição destroem ainda mais o seu habitat, impossibilitando-os de sobreviver. As temperaturas elevadas experienciadas num mesocosmo demonstram que os cavalos-marinhos adultos possuem resiliência à temperatura, contudo o mesmo não se sucede com o efeito combinado do aumento da temperatura e diminuição do pH. O mesmo pode não se verificar para os juvenis, uma vez que podem não ter totalmente desenvolvidas as estruturas que lhes permite sobreviver em tais condições. Além destes juvenis enfrentarem uma mortalidade de vida elevada, o sucesso de sobrevivência com as alterações climáticas é ainda mais diminuído. A monitorização destas populações é essencial de forma a existir uma clara precisão da dinâmica destas populações. Desta forma é possível implementar medidas concisas, como áreas marinhas protegidas para que não só a espécie possa sobreviver e prosperar, como o seu habitat e comunidade envolvente.

Palavras chave: aquecimento dos oceanos, acidificação dos oceanos, *stress* oxidativo, *Hippocampus reidi*

Índice

1. Introdução	13
1.1. Alterações climáticas	13
1.2. Aquecimento dos oceanos	15
1.3. Acidificação dos oceanos.....	18
1.4. Adaptações fisiológicas às alterações climáticas: Biomarcadores de <i>stress</i> oxidativo	20
1.4.1. Proteínas de choque térmico (HSP).....	20
1.4.2. Ubiquitinas.....	22
1.4.3. Peroxidação lipídica.....	23
1.4.4. Dano de ADN	23
1.5. Modelo biológico: O cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i>	24
1.5.1. Biologia e Ecologia	24
1.5.2. Cavalos-marinhos e o impacto das alterações climáticas	26
1.5.3. Conservação dos cavalos-marinhos.....	27
2. Objetivos.....	28
3. Materiais e métodos.....	28
3.1. Aclimação dos indivíduos	28
3.2. Análise de biomarcadores de <i>stress</i> oxidativo	29
3.2.1. Preparação dos tecidos	29
3.2.2. Proteínas de choque térmico (HSP).....	29
3.2.3. Ubiquitinas.....	30
3.2.4. Peroxidação lipídica.....	30
3.2.5. Dano de ADN	31
3.3. Análise dos dados	31
4. Resultados	32
4.1. Proteínas de choque térmico (HSP).....	32
4.2. Ubiquitinas.....	32
4.3. Peroxidação lipídica.....	33
4.4. Dano de ADN	34
5. Discussão	35
6. Conclusões e perspetivas futuras.....	38
7. Referencias bibliográficas.....	39
8. Anexos	57

Lista de figuras e tabelas

Figura 1: Temperatura global (°C) e concentração de CO ₂ (ppmv) na atmosfera. Fonte: Karl & Trenberth 2003.....	13
Figura 2: Alterações globais na concentração média de CO ₂ atmosférico para os diversos cenários RCPs. Fonte: IPCC, 2014.....	14
Figura 3: Efeito das alterações climáticas nos oceanos. Fonte: Harley <i>et al.</i> 2006.....	15
Figura 4: Mudanças recentes na temperatura dos oceanos. (A) Anomalia da temperatura da superfície dos oceanos em janeiro de 2010 em relação à média de 1951-1980. (B) os mesmo dados representados em (A) em função da latitude. Fonte: Meehl <i>et al.</i> 2007.	16
Figura 5: Respostas ecológicas às alterações climáticas. A cor verde escura representa o ciclo de vida de uma espécie marinha. As caixas amarelas representam as mudanças ambientais que influenciam a dispersão e o recrutamento, nas várias fases do ciclo de vida. A azul, os efeitos gerados na comunidade derivado do tamanho da população e dos efeitos per capita das espécies em interação. As respostas ecológicas incluem alterações no desempenho do indivíduo, dinâmica das populações e estrutura das comunidades. Fonte: Harley <i>et al.</i> 2006.....	17
Figura 6: Distribuição geográfica da população de <i>Hippocampus reidi</i> . Fonte: IUCN 2017	25
Figura 7: Indivíduo adulto da espécie <i>H. reidi</i> . Fonte: https://www.inaturalist.org	25
Tabela I: Condições experimentais às quais os juvenis de os cavalos-marinhos. <i>H.reidi</i> foram expostos durante um mês.....	29
Figura 8:Efeito do aquecimento e acidificação dos oceanos na concentração de HSP70 nos tecidos da espécie de cavalo-marinho <i>H. reidi</i> . Os valores representam a media ± desvio padrão (DP). A linha azul representa o tratamento experimental de controlo e a linha verde representa a acidificação. Sendo que as letras a e b representativas das diferenças estatísticas.	32
Figura 9: Efeito do aquecimento e acidificação dos oceanos na concentração de ubiquitinas nos tecidos da espécie de cavalo-marinho <i>H. reidi</i> . Os valores representam a media ± DP. A linha azul representa o tratamento experimental de controlo e a linha verde representa a acidificação. Sendo que as letras a, b, c e d representativas das diferenças estatísticas.	33
Figura 10: Efeito do aquecimento e acidificação dos oceanos na concentração de MDA. Os valores representam a media ± DP. A linha azul representa o tratamento experimental de controlo e a linha verde representa a acidificação. Sendo que as letras a e b representativas das diferenças estatísticas.	34
Figura 11: Efeito do aquecimento e acidificação dos oceanos na concentração de ADN (ABS mg-1 proteína). Os valores representam a media ± DP. A linha azul representa o tratamento experimental de controlo e a linha verde representa a acidificação. Sendo que as letras a e b representativas das diferenças estatísticas.	35
Tabela II: Vários tipos de stress oxidativo.....	57
Tabela III: Resultados estatísticos obtidos pelo Rstudio. Dados obtidos para o estudo às respostas fisiológicas dos juvenis <i>Hippocampus reidi</i> , os biomarcadores: HSP e ubiquitinas, e o produtos do stress oxidativo, MDA e danos de ADN.	58

Lista de abreviações e símbolos

GEE	Gases de efeito estufa	DP	desvio padrão
CO₂	Dióxido de carbono	ATP	Trifosfato de adenosina
ppm	Partes por milhão	G:C	Guanina: Citocina
ppmv	Partes por milhão de volume	O₂²⁻	Ião peróxido
°C	Graus Celcius	m	Metros
RCP	Patamares de concentração representativos	CITES	Convenção internacional sobre o comercio internacional de espécies em perigo
µatm	Microatmosferas	%	Porcentagem
kg	Quilograma	AMPs	Áreas marinhas protegidas
Gt	Gigantones	mg	Miligramas
mm	Milímetros	PBS	Solução salina de tampão fosfato
O₂	Oxigênio	NaOH	Hidróxido de sódio
Tp	Temperatura de pejus	NaCl	Cloreto de sódio
CO₃	Carbonato	mM	Milimolar
CaCO₃	Carbonato de cálcio	KCl	Cloreto de potássio
H₂CO₃	Ácido carbónico	Na₂ PO₄	Fosfato de sódio
HCO₃⁻	Bicarbonato	µg	microgramas
H⁺	Ião de Hidrogênio	M	Massa molar
pCO₂	Pressão parcial de CO ₂	µl	microlitros
ROS	Espécies reativas de oxigênio	BSA	Albumina sérica bovina
HSP	Proteínas de choque térmico	ml	Mililitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico	h	Horas
HSR	Resposta de choque térmico	GLM	Modelos lineares generalizados
kDa	unidade do peso molecular	ABS	Absorvância
LPO	Peroxidação lipídica	nm	nanômetros
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados	TBARS	Acido tiobarbitúrico
H₂O	Água	SDS	Dodecilsulfato de sódio
MDA	Malondialdeído	mg	miligramas
HO•	Radical hidroxilo	min	Minutos
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio	v	volume
rpm	Rotações por minuto	AIC	<i>Akaike information Criterion</i>
nmol	Nanomole	etc	“ <i>etecetera</i> ”
IUCN	<i>União internacional para a conservação da natureza, lista vermelha de espécies ameaçadas</i>	HCl	Ácido clorídrico
ng	Nanograma		

1. Introdução

1.1. Alterações climáticas

A vida no planeta Terra tal como a conhecemos deve-se em grande parte não só à sua localização em relação ao sol, mas também devido ao efeito de estufa que ocorre naturalmente na atmosfera e que serve para manter a temperatura do planeta (Karl & Trenberth 2003). Contudo, desde a revolução industrial que algumas atividades antropogénicas têm alterado o balanço dos gases de efeito de estufa (GEE), e contribuído assim para o drástico aumento destes na atmosfera e do efeito de estufa (Hallett 2002). Os principais gases que contribuem para o aumento do efeito de estufa são, o vapor de água (60%), dióxido de carbono (CO₂, 25%), metano (15-20%) ozono (8%), e protóxido de azoto (6%), entre outros (Kiehl *et al.* 1997). As mudanças existentes na composição da atmosfera resultam maioritariamente da queima de combustíveis fósseis (tais como o carvão, gás natural e derivados de petróleo) que consequentemente conduzem ao aumento da concentração de CO₂, metano e óxido nítrico (Karl & Trenberth 2003). Como estes gases têm um tempo de vida longo, a sua permanência e acumulação na atmosfera pode atingir décadas a séculos. Desde a época pré-industrial, a concentração do CO₂ na atmosfera aumentou cerca de 31%, de 280 partes por milhão (ppm) (Karl & Trenberth 2003) até às atuais 410,06 ppm (CO₂.Earth. 2019), tendo-se verificado metade deste aumento desde 1956 (Figura 1) (Karl & Trenberth 2003; Doney *et al.* 2009; Hönlisch *et al.* 2012; IPCC 2014).

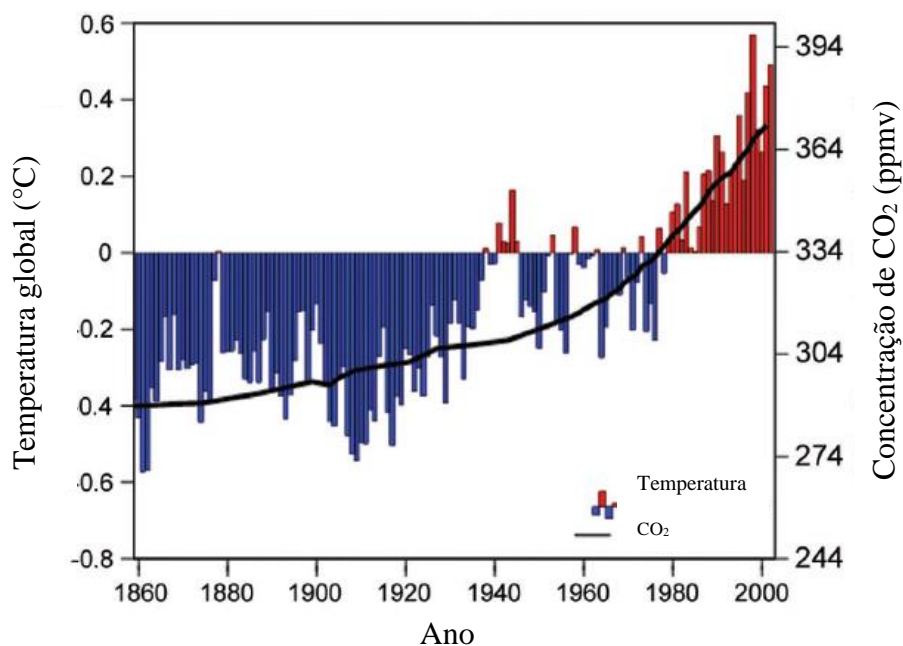


Figura 1: Temperatura global (°C) e concentração de CO₂ (ppmv) na atmosfera. Fonte: Karl & Trenberth 2003.

O aumento dos GEE impede a radiação solar de ser refletida para o espaço, deste modo parte da energia térmica que de outra forma seria irradiada para o espaço é retida. Como consequência, o aquecimento global do

planeta tem vindo a aumentar exponencialmente nas últimas décadas, sendo expectável que aumente mais 1,1-6,4°C até 2100 (Meehl *et al.* 2007), tendo se verificado um aumento de 0,07°C por década desde 1880 (NOAA 2019). Por este motivo, este tema tem recebido uma atenção considerável pela comunidade científica, existindo uma clara noção do paralelismo entre o aumento dos níveis de dióxido de carbono, resultado das atividades antropogénicas, e o aumento da temperatura média da Terra (Raven *et al.* 2005). Deste modo, é necessário compreender as alterações climáticas e os seus impactos de forma a prever e antever futuros problemas. Para isso, foram criados um conjunto de diferentes cenários, os Patamares de Concentração Representativos RCP (*Representative Concentration Pathways*) que são indicadores utilizados para fazer projeções baseadas nas emissões antropogénicas de GEE até 2100 (Figura 2) (IPCC 2014).

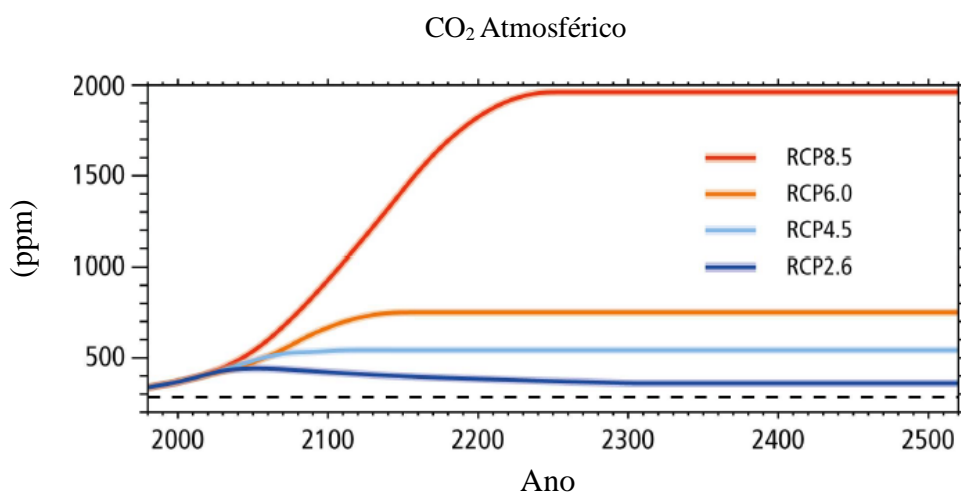


Figura 2: Alterações globais na concentração média de CO₂ atmosférico para os diversos cenários RCPs. Fonte: IPCC, 2014.

Estes RCPs são utilizados de forma a descrever quatro diferentes cenários de emissões de GEE e suas concentrações atmosféricas, emissões de poluentes do ar e uso da terra até ao final do século (IPCC 2014). Os RCPs incluem um cenário de mitigação rigoroso (RCP 2,6) na qual existe uma participação precoce de todos os emissores para a remoção ativa do CO₂ (IPCC 2014). O RCP 2,6 é representativo de um cenário que visa manter o aquecimento global abaixo de 2°C acima das temperaturas pré-industriais (IPCC 2014). Existem outros três cenários o intermédio RCP 4,5 equivalente a um esforço mínimo na redução das emissões (IPCC 2014), o RCP 6,0 e um cenário com emissões altas de GEE (RCP 8,5). Sem esforços adicionais para restringir as emissões prevê-se que os cenários variam entre o RCP 6,0 e 8,5. Atualmente, o valor observado de concentração de CO₂ atmosférico é o mais elevado comparativamente aos últimos 800.000 anos, devido ao aumento da dependência do homem pela queima de combustíveis fósseis (IPCC 2014). No cenário RCP 8,5 é expectável que até 2100 estas emissões subam até 1000 μatm (IPCC 2014). A atmosfera constituiu um dos pequenos reservatórios de CO₂ (Oelkers & Cole 2008), no total apenas 0,1% de carbono é armazenado na atmosfera, existindo uma constante troca de carbono entre reservatórios (Oelkers & Cole 2008). Contudo, o CO₂ atmosférico pode ter outros dois destinos, pode ser absorvidos pela biosfera terrestre ou pelos oceanos (Le Quéré *et al.* 2009). Estes

reservatórios terrestres e oceânicos ao absorverem o crescente aumento de carbono atmosférico mitigam os efeitos das alterações climáticas, no entanto, a sua eficiência pode diminuir ao longo do tempo.

Para além dos efeitos sentidos a nível terrestre, a elevada concentração de CO₂ na atmosfera e o aumento das temperaturas globais têm resultado consequentemente em alterações físicas e químicas no ambiente marinho (Figura 3). Os oceanos cobrem 71% da superfície terrestre (Hoegh-guldberg 2010) e possuem um enorme valor socioeconómico, na produção de alimento, reciclagem de nutrientes, recreação, desempenham ainda um importante papel no ciclo global do carbono (Costanza *et al.* 1997) e servem de abrigo a milhares de espécies que vivem em diversos habitats (Raven *et al.* 2005). Por todas estas características torna-se imprescindível perceber como as alterações climáticas afetarão os oceanos (Miller 2009), e qual o ritmo e extensão dos efeitos das alterações climáticas no futuro (Field *et al.* 2013).

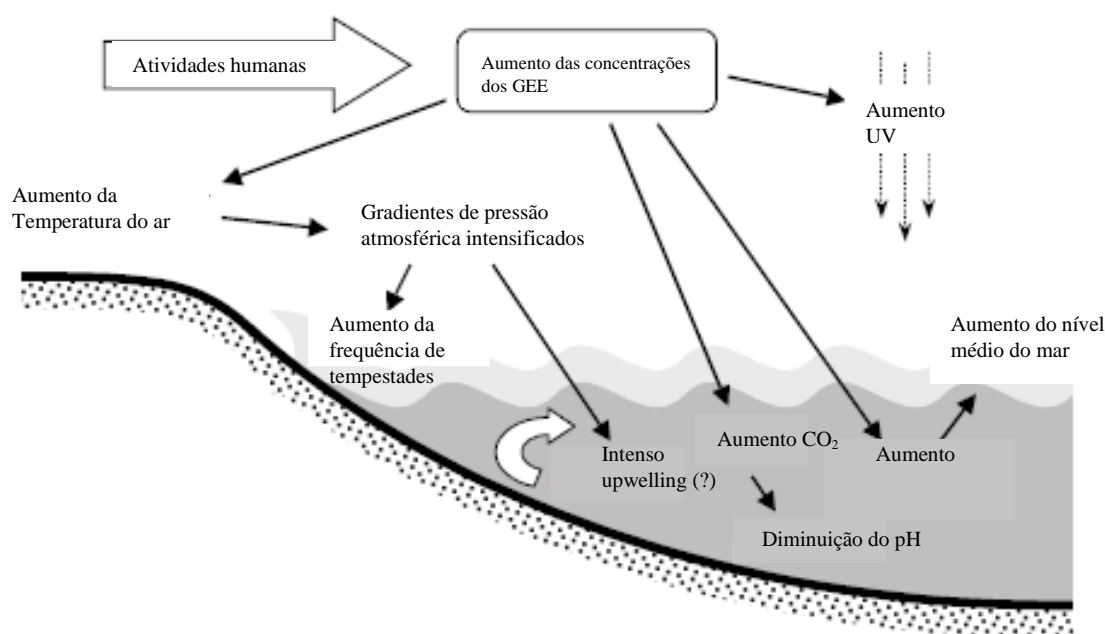


Figura 3: Efeito das alterações climáticas nos oceanos. Fonte: Harley *et al.* 2006.

1.2. Aquecimento dos oceanos

Apesar dos oceanos absorverem mais de 80% do calor do sistema climático global, a sua capacidade térmica permite que as águas superficiais dos oceanos aqueçam a um ritmo inferior (3x) do que ao das temperaturas atmosféricas da terra (IPCC 2007). No entanto, as crescentes concentrações atmosféricas dos GEE levaram a uma subida das temperaturas médias dos oceanos em aproximadamente 0,2°C por década nos últimos 30 anos (Hansen *et al.* 2006). Como resultado, a temperatura média das camadas superficiais da coluna de água (100 m)

dos oceanos tem vindo a aumentar exponencialmente (Levitus *et al.* 2009), cerca de 0,6°C ao longo dos últimos 100 anos (IPCC 2007) (Figura 5A e 5B).

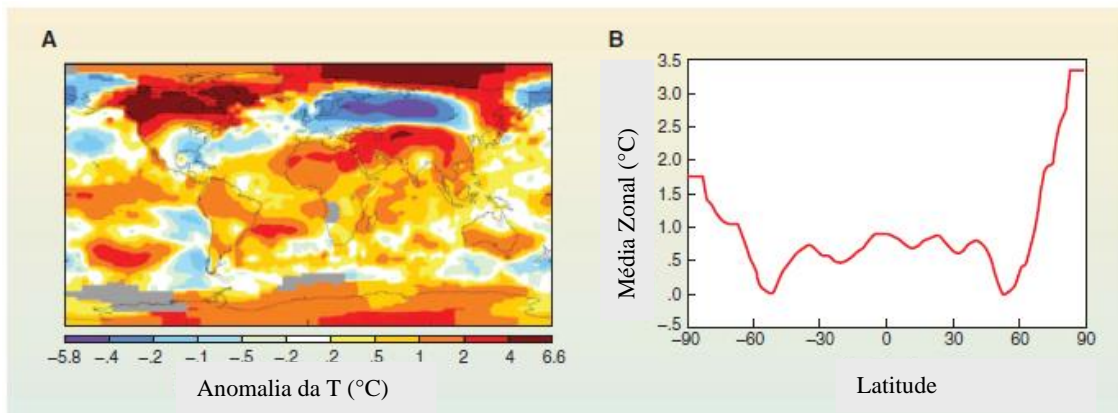


Figura 4: Mudanças recentes na temperatura dos oceanos. (A) Anomalia da temperatura da superfície dos oceanos em janeiro de 2010 em relação à média de 1951-1980. (B) os mesmo dados representados em (A) em função da latitude. Fonte: Meehl *et al.* 2007.

Caso se mantenha esta tendência, coloca-se em causa uma série de variáveis abióticas e bióticas, com graves consequências para a vida marinha. Devido ao aumento da temperatura, o degelo de glaciares terrestres tem conduzido à subida do nível médio do mar (Rahmstorf *et al.* 2007), cerca de 2 mm/ano (IPCC 2001) alterando as características físico-químicas da água. Isto resulta em alterações na salinidade, estratificação da coluna de água (Hoegh-guldberg 2010), ocorrência de tempestades mais frequentes e intensas (Knutson *et al.* 2010), entre outras alterações no ciclo hidrológico (Trenberth & Josey 2007). Outro fenómeno resultante da subida da temperatura, é a distribuição desigual do calor, que influencia fortemente as correntes do oceano (Alheit & Bakun 2010), sendo que estas desempenham papéis fundamentais na dinâmica do clima e biologia dos oceanos, tal como a distribuição e abundância de muitas espécies marinhas (Hoegh-guldberg 2010).

As respostas dos organismos marinhos às alterações climáticas dependem da sua relação com o meio ambiente, dinâmica populacional, estrutura da comunidade e processos inerentes ao organismo (Figura 5) (Harley *et al.* 2006). Os efeitos das alterações climáticas (Figura 5, diagramas a amarelo) podem ser observáveis na performance dos organismos em várias fases do seu ciclo de vida (Figura 5, diagramas a verde escuro), através de modificações fisiológicas, morfológicas e ou comportamentais (Harley *et al.* 2006). Os impactos climáticos verificam-se consequentemente ao nível das populações (Figura 5, diagramas a azul) influenciando a dispersão e recrutamento e também ao nível da comunidade pela interação entre espécies (ex. predadores e competidores), incluindo alterações na abundância e na força de interação, per capita, dessas espécies (Harley *et al.* 2006) A combinação desses impactos pode resultar em respostas ecológicas emergentes, que incluiu alterações na distribuição das espécies, diversidade, produtividade e processos micro-evolutivos (Harley *et al.* 2006).

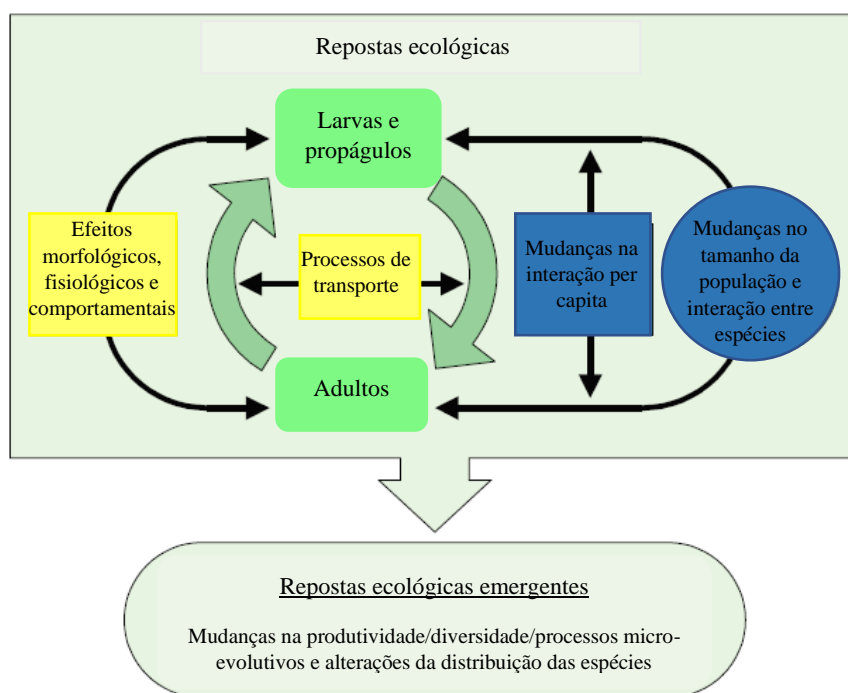


Figura 5: Respostas ecológicas às alterações climáticas. A cor verde escura representa o ciclo de vida de uma espécie marinha. As caixas amarelas representam as mudanças ambientais que influenciam a dispersão e o recrutamento, nas várias fases do ciclo de vida. A azul, os efeitos gerados na comunidade derivado do tamanho da população e dos efeitos per capita das espécies em interação. As respostas ecológicas incluem alterações no desempenho do indivíduo, dinâmica das populações e estrutura das comunidades. Fonte: Harley et al. 2006

Estas alterações de temperaturas têm promovido modificações em alguns processos fenológicos, tais como no início da época de reprodução e no crescimento (IPCC 2007). Variações da temperatura promovem impactos negativos não só a níveis tróficos superiores (consumidores) mas também a nível da produção primária (Hoegh-guldberg 2010). A produtividade primária anual do oceano diminuiu 6% desde 1980, em que 70% deste declino ocorreu a latitudes mais altas (Gregg *et al.* 2003; Polovina *et al.* 2008) e com diminuições drásticas no Pacífico e no Oceano Índico (Polovina *et al.* 2008). O aumento da temperatura levou a uma diminuição do tamanho individual do fitoplâncton (Perissinotto & Pakhomov 1998), o que alterou ainda mais o funcionamento e bioquímica dos ecossistemas pelágicos superficiais (Hoegh-guldberg 2010). Em geral, estas mudanças na produção primária tem implicações profundas na biosfera marinha, principalmente no armazenamento de carbono, uma vez que o seu potencial retenção diminui (Falkowski *et al.* 2000). A temperatura tem um importante papel sobre os processos biológicos, pela sua influência na energia cinética molecular (distribuição de energia Maxwell-Boltzmann), na qual a temperatura determina a taxa de processos fundamentais, tais como, reações enzimáticas, difusão, e transportes membranares. Para além disto, a temperatura altera processos fisiológicos que vão desde o dano proteico à fluidez da membrana, até à função de órgãos (Hochachka & Somero 2002).

No geral, os peixes são ectotérmicos, isto é, a sua temperatura interna varia com a temperatura exterior, resultando num aumento das taxas metabólicas com o aumento da temperatura no ambiente (Roessig *et al.*

2004). Sendo estas espécies sensíveis à temperatura do meio envolvente, um aumento da temperatura de apenas 1°C, pode produzir efeitos deletérios nos organismos e conseqüentemente alterações na sua distribuição geográfica (Kennedy *et al.* 2002; Perry *et al.* 2005; Brierley & Kingsford 2009). Além disto, a temperatura e a disponibilidade de oxigênio (O₂) estão dependentes uma da outra e assim quando existe um aumento da temperatura, ocorre a diminuição de O₂ disponível. Este aumento da temperatura também resulta numa demanda maior de O₂ pelo animal, podendo esta mudança representar sérios problemas para a sua sobrevivência (Pörtner & Knust 2007), incluindo alterações negativas no sistema cardiorrespiratório dos peixes (Pörtner & Knust 2007).

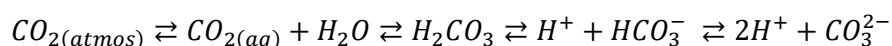
Acima de uma determinada temperatura, também conhecida como temperatura de *pejus* (T_p), a oferta de oxigênio é máxima e não pode subir ainda mais de forma a cobrir as elevadas demandas metabólicas, deste modo a capacidade de um organismo aumentar o seu metabolismo aeróbio fica comprometida (Pörtner *et al.* 2004; Portner *et al.* 2005). Temperaturas acima do limite teórico referido anteriormente não colocam em risco imediato a sobrevivência de espécies. Contudo, necessidades fisiológicas como alimentação, crescimento, reprodução, recrutamento (Mora & Ospina 2001; Pörtner & Knust 2007), poderão ser afetadas a longo termo, afectando por exemplo a frequência de desova e sobrevivência dos ovos, larvas e juvenis (IPCC 2001). A nível comportamental, ocorrem mudanças em termos de estratégias reprodutivas e nos seus padrões de vida (Angilletta *et al.* 2006). Apesar disto, os organismos possuem alguma resiliência, conseguindo aclimatar a uma série de temperaturas em redor das suas temperaturas ótimas (Hochachka & Somero 2002). Quando este valor à volta das suas temperaturas ótimas é gravemente ultrapassado, o risco de mortalidade aumenta, o seu *fitness* é reduzido, e as populações declinam e/ou podem ficar em perigo de extinção (Hochachka & Somero 2002).

1.3. Acidificação dos oceanos

Desde o início da revolução industrial que os níveis de CO₂ têm aumentado para níveis nunca antes registados (Wood *et al.* 2009). Caso as emissões antropogénicas não sejam reduzidas substancialmente, os níveis de CO₂ atmosférico continuarão a aumentar até ao próximo século (Raven *et al.* 2005). Este aumento de CO₂ atmosférico é a causa primária não só do aquecimento global e dos oceanos, mas também da acidificação dos oceanos (Raven *et al.* 2005). Os oceanos são importantes reservatórios de carbono, pois sequestram elevadas concentrações de CO₂ da atmosfera. Esta elevada absorção de CO₂ promove a redução do pH dos oceanos. Desde a época pré-industrial, o pH médio dos oceanos diminuiu 0,1 unidades, de aproximadamente de 8,21 para 8,10 (Raven *et al.* 2005), sendo expectável que até final do século diminua cerca de 0,3-0,4 unidades de pH (Orr *et al.* 2005), caso as concentrações de CO₂ atmosférico atinjam valores superiores a 800 ppmv (IPCC 2014).

Embora a magnitude do impacto da acidificação varie com a profundidade (Caldeira & Wickett 2003), latitude (Orr *et al.* 2005) e habitat, o seu efeito na química da água afeta todo o tipo de organismos (Wood *et al.* 2009). Um organismo é afetado pela acidificação dos oceanos de duas maneiras, não só devido à diminuição do pH, mas também devido ao aumento de CO₂ (hipercapnia) (Wood *et al.* 2009). Diferentes espécies e grupos de animais marinhos variam a sua capacidade de compensar a hipercapnia e diminuição do pH. Com a diminuição

da disponibilidade do íon de carbonato (CO_3), e a consequente redução do carbonato de cálcio (CaCO_3), reduz-se a capacidade de calcificação de vários organismos marinhos, tais como moluscos, corais, e crustáceos, por exemplo (Hoegh-Guldberg *et al.* 2007; Kroeker *et al.* 2010).



Uma vez dissolvido na água, o dióxido de carbono reage para formar ácido carbónico (H_2CO_3), que ao perder íões de hidrogénio, forma íões de bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}) (Doney *et al.* 2009). A absorção de CO_2 pelos oceanos aumenta a concentração aquosa de CO_2 , bicarbonato e íões de hidrogénio; este último diminui o pH, pois $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$ (Doney *et al.* 2009). A concentração dos íões de carbonato vai diminuindo, à medida que a concentração de H^+ na água vai aumentando (Doney *et al.* 2009). A diminuição de pH estimada para o final do século 21 equivale aproximadamente a um aumento de 150% de íões H^+ e diminuição de 50% nas concentrações de carbonato (Orr *et al.* 2005). Assim sendo, não só a diminuição da saturação carbonato de cálcio, mas também as concentrações elevadas de $p\text{CO}_2$ (pressão parcial de CO_2) podem afetar os organismos, tal como o equilíbrio acido-base de cada indivíduo (Fabry *et al.* 2008). Trabalhos recentes indicam que a crescente absorção de CO_2 somado à poluição por outros contaminantes pode trazer consequências desastrosas ao nível da biodiversidade, interações tróficas e em processos chave nos ecossistemas (Raven *et al.* 2005; Kleypas *et al.* 2006). Diversas espécies marinhas irão variar a sua resposta de forma a compensar a hipercapnia e a diminuição do pH (Pörtner *et al.* 2004). Esta alteração nos oceanos leva a que níveis tróficos inferiores sejam afetados, como é o caso dos produtores, nomeadamente fitoplâncton. Este aumento de CO_2 altera a composição química da água, diminuindo a disponibilidade de nutrientes para os organismos marinhos, resultando numa diminuição do crescimento destes organismos fotossintéticos (Raven *et al.* 2005). Esta diminuição no crescimento de produtores, faz com que não haja alimento suficientemente disponível para os consumidores de primeira ordem e assim sucessivamente, colocando em causa toda a cadeia trófica de um ecossistema. Espécies com esqueletos carbonatados, como moluscos, crustáceos e equinodermes, são particularmente suscetíveis a estas condições, uma vez que dependem dos íões CaCO_3 para a calcificação do seu esqueleto. Como consequência, pode ocorrer uma diminuição das taxas de calcificação e estes organismos podem sofrer dissolução da concha/casca/exosqueleto. Para além destas consequências, as taxas de crescimento e taxas metabólicas destes organismos podem ser negativamente afetadas (Feely *et al.* 1988, 2004; Gattuso & Buddemeier 2000; Gattuso *et al.* 2002; Basile *et al.* 2005), podendo mesmo ocorrer supressão metabólica. Contrariamente, organismos não calcificadores como peixes adultos, cefalópodes e outros vertebrados, têm capacidade de compensar as diferenças de pH devido à sua capacidade de manter a sua homeostasia interna (Hu *et al.* 2015). Estes animais desenvolveram um mecanismo eficaz na regulação acido-base, em que o bicarbonato acumulado em situação de hipercapnia troca íões com o meio exterior, pelas brânquias (Portner *et al.* 2005; Ishimatsu *et al.* 2008; Melzner *et al.* 2009). O mesmo não se sucede com estágios de vida inicial, dado que estes organismos ainda não desenvolveram a sua capacidade de regular íões (Morris *et al.* 1989; Sayer *et al.* 1993). A acidificação dos oceanos afecta também o crescimento, sobrevivência (Baumann *et al.* 2012; Pimentel *et al.* 2014b; Pimentel *et al.* 2016), equilíbrio acido-base (Fabry *et al.* 2008; Pimentel *et al.* 2014; Hu *et al.* 2015),

capacidade de transporte de oxigénio e o seu consumo (Fabry *et al.* 2008; Rosa *et al.* 2014a; Pimentel *et al.* 2015), capacidade enzimática (Wittmann & Pörtner 2013; Rosa *et al.* 2016; Sampaio *et al.* 2018; Sampaio & Rosa 2019), sistema neurológicos e alteração comportamental de diversas espécies (McNeil & Sasse 2016).

1.4. Adaptações fisiológicas às alterações climáticas: Biomarcadores de *stress* oxidativo

Os organismos marinhos estão expostos a uma série de variantes ambientais, das quais têm de se ajustar de forma a manter a sua homeostasia, para que possam crescer e reproduzir-se (Lesser 2006). Como em qualquer outro processo metabólico, a produção de ROS varia segundo os gradientes ambientais, sendo necessário que o organismo ajuste as suas defesas antioxidantes de forma a manter os níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS) baixos, prevenindo danos celulares e *stress* oxidativo (Lesser 2006). Os ROS são moléculas e radicais livres que são naturalmente produzidos como subprodutos da respiração aeróbica (Cadenas 1989; Pannunzio & Storey 1998; Lesser 2006), sendo importantes na sinalização celular e homeostasia (Cadenas 1989). São responsáveis pela toxicidade do oxigénio, devido à redução univalente do oxigénio molecular, produzindo intermediários reativos, tais como o anião superóxido $O_2^{\bullet-}$, o peróxido de hidrogénio H_2O_2 , HO^{\bullet} , e por fim, água (Halliwell & Gutteridge 1999; Lesser 2006). Estes compostos são produtos naturais do metabolismo do oxigénio. Com o efeito das alterações climáticas, a capacidade da célula responder a esta oxidação é alterada, resultando em *stress* oxidativo (Lesser 2011). Por exemplo, as alterações climáticas diminuem a produção de antioxidantes em foto-autotróficos, dado que com o aumento da temperatura, a fixação do carbono é máxima de forma a maximizar a energia celular para o crescimento e não em resposta ao *stress* oxidativo (Ursi *et al.* 2003; Choo *et al.* 2004).

Contudo, durante períodos de *stress* ambiental (e.g. aumento da temperatura, diminuição do pH e contaminação), os níveis de ROS aumentam drasticamente produzindo consequentemente um aumento de *stress* oxidativo (Cadenas 1989; Vinagre *et al.* 2012). Normalmente, os organismos marinhos exibem um poderoso conjunto de mecanismos, tais como os antioxidantes, para reparação e remoção de proteínas de forma a compensar a produção de ROS e evitar o *stress* oxidativo e naturalmente danos bioquímicos (Lushchak 2011). Quando expostos a *stress* ambiental existe uma maior produção de ROS e diminuição da eficiência dos seus sistemas de eliminação. Caso os mecanismos de defesas intracelulares, tais como as proteínas de choque térmico (HSP), ubiquitinas e uma série de enzimas antioxidantes (e.g. catalase, glutathione-S transferase, superóxido dismutase) não consigam balancear as consequências deste *stress* oxidativo, podem ocorrer danos ao nível celular tais como a peroxidação lipídica, a degradação de proteínas e danos de ADN (Lopes *et al.* 2013; Halliwell & Gutteridge 1999; González *et al.* 2015).

1.4.1. Proteínas de choque térmico (HSP)

A fim de evitar efeitos adversos provocados por alterações ambientais, os organismos marinhos possuem alguns mecanismos fisiológicos de defesa, tais como a produção de proteínas originadas durante *stress* térmico ou

como “resposta de choque térmico” (HSR) (Feder & Hofmann 1999; Lesser 2006). Estas HSPs pertencem a um grupo de chaperões moleculares que estão envolvidos na manutenção funcional das células (Sørensen *et al.* 2003b). As HSPs desempenham um papel importante na proteção nas células contra diversos agentes agressivos gerados por uma variedade de *stresses* (Kregel 2002). Diversas famílias de HSP foram identificadas e nomeadas de acordo com a sua massa molecular. Estas foram classificadas em seis grandes famílias: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP40 e pequenas HSP ou sHSP (de peso molecular 12-43 kDa (Lindquist 1986; Sørensen *et al.* 2003b; Bakthisaran *et al.* 2015). Estão presentes no citosol, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo da célula, embora o local varie dependendo da proteína específica (Kregel 2002). A HSP mais abundante é a HSP70, encontrada tanto em eucariotas como em procariontes. Esta família de HSPs tem cerca de 50% de similaridade de aminoácidos entre as espécies *Escherichia coli* e *Homo sapiens*, e aproximadamente 70% entre *Drosophila melanogaster* e *H. sapiens* (Lindquist 1986; Schlesinger 1990). Estas proteínas embora partilhem as mesmas sequências proteicas, a sua síntese ocorre devido a estímulos diferentes (Kregel 2002). O grau de conservação destas proteínas em todas as espécies, aliado à sobrevivência celular em diversas condições, sugere que estas HSP são fundamentais para a sobrevivência após a indução de *stress* (Kregel 2002). Uma das primeiras alterações associadas ao *stress* induzido pela acumulação de HSP70 é a termotolerância, sendo esta definida pela capacidade da célula ou mesmo o organismo resistir a *stress* térmico quase letal, após a exposição a temperaturas elevadas, (Landry *et al.* 1982; Li & Werb 1982; Landry & Chrétien 1983; Mizzen & Welch 1988). As proteínas HSP são sensíveis a alterações de temperaturas elevadas (e outros *stresses* também representados na Tabela II em anexo), sendo consideradas as mais importante quando se estuda o impacto do *stress* térmico (Feder & Hoffman 1999; Hoffman *et al.* 2003). As HSP70 estão também associadas ao desenvolvimento de tolerância a uma série de pressões, incluindo hipoxia (Guttman *et al.* 1980; Hahn & Li 1982), exposição a radiação ultravioleta (Barbe *et al.* 1988), isquemia (Marber *et al.* 1995), acidose (Weitzel *et al.* 1985), perdas energéticas (Sciandra & Subjectk 1983) e citocinas (Jaattela 1993). Estas proteínas possuem um papel importante em diversas funções de manutenção do proteoma, incluindo *foldings* de novo, *refoldings* e reparação de proteínas desnaturadas, remoção de proteínas danificadas/desnaturadas e no controlo de formação de ROS (Feder & Hoffman 1999; Sørensen *et al.* 2003b; Dong *et al.* 2008; Tomanek 2010). Numa fase inicial, as HSP estabilizam a proteína de forma a impedir a total desnaturação e posteriormente ajudam a proteína a regressar à sua conformidade inicial (Tomanek 2010). Caso não seja possível esta regressão ao estágio inicial, as HSPs fazem com que estas proteínas danificadas irreversivelmente sejam processadas pelo ciclo proteolítico da célula (Tomanek 2010). A síntese e degradação de HSPs requer que parte dos nutrientes e energia armazenados na célula sejam consumidos, pelo que este mecanismo de defesa contra *stress* térmico exige aos organismos um gasto de energia extra, podendo mesmo colocar em causa a sua integridade celular, *fitness*, crescimento e reprodução. Contudo, a produção de HSPs em altas concentrações pode ser tóxica, interferindo diretamente em outros processos celulares, podendo mesmo chegar a alterar a função das células (Lindquist 1993).

Os organismos marinhos que habitem em zonas intertidais, têm uma maior capacidade de ajustar os níveis de HSP e ajustar a sua resposta face às oscilações ambientais a que estão diariamente sujeitos, como por exemplo temperatura, radiação ultravioleta, níveis de oxigénio, *etc* (Tomanek 2010; Freire *et al.* 2011). Os

cnidários da zona intertidal, como a *V. cynomorium* estão habituadas a enfrentar transições entre a hipoxia e a reoxigenação, sem sofrer qualquer dano nos tecidos, o que se verifica no estudo de Teixeira *et al.* (2013), onde estes espécimes sobreviveram a 2,5h expostos ao ar. Mas nem sempre os organismos têm capacidade de resposta face às alterações no seu habitat. Em que a privação de oxigénio leva à produção de HSP, como é demonstrado pelas ostras (David *et al.* 2005) e a tilápia do Nilo (Delaney & Klesius 2004). Em estádios de vida mais primordiais, como é o caso das larvas de linguado (*Solea senegalensis*), em condições de aumento da temperatura e diminuição do pH existe a produção de HSP (Pimentel *et al.* 2015), o que se traduz numa resposta oxidativa. A ativação constante de HSR acarreta custos a longo prazo, prejudiciais ao *fitness* e restringe os nichos térmicos nos quais a espécie pode ocorrer (Tomanek 2010).

Os genes associados às HSP podem ser encontrados em todos o tipo de organismos, desde bactérias a plantas e animais (Sørensen *et al.* 2003b). A reduzida variação genética e universalidade das HSP, sugere uma importância evolutiva e um papel significativo na proteção de células antes, durante e após a indução de *stress* (Lindquist 1986; Feder & Hoffman 1999). Devido à sua capacidade de resposta a diversos *stresses*, as HSP são aplicadas em diversas áreas de investigação tal como a biomonitorização e toxicologia ambiental (Ryan & Hightower 1996; de Pomerai 1996). Por este motivo, as HSPs são considerados biomarcadores especialmente úteis devido da sua grande sensibilidade não só ao *stress* térmico (Feder & Hoffman 1999), mas também a poluentes e toxinas ambientais (Feder & Hoffman 1999; Fonseca *et al.* 2011; Anacleto *et al.* 2014; Rosa *et al.* 2014b; Maulvault *et al.* 2016).

1.4.2. Ubiquitinas

A ubiquitina é uma proteína regulatória pequena mas muito estável fisicamente, podendo suportar temperaturas acima dos 85°C e um intervalo de pH entre 1-13 (Lenkinski *et al.* 1977). A ubiquitina é uma proteína de resíduo altamente conservada (Hanna *et al.* 2007) e uma das mais abundantes em células eucarióticas, sendo a sua sequência de aminoácidos bem conhecida (Goldstein *et al.* 1975; Gavilanes *et al.* 1982; Wilkinson 1995). Estas proteínas ocorrem em células livres ou ligadas covalentemente a proteínas (Hershko & Ciechanover 1998; Hershko 2002) através do seu terminal carboxílico e grupos t-amino de resíduos de lisina, numa grande variedade de proteínas intracelulares, sendo a mais abundante, a histona H2A (Atidia & Kulka 1982; Chin *et al.* 1982). Das funções que as ubiquitinas exercem, as mais conhecidas são as histonas H2A e H2B durante o crescimento celular na interfase e a modificação de proteínas celulares, conduzindo à degradação proteolítica (Bond *et al.* 1988). Estas têm portanto um papel fundamental na manutenção da homeostasia celular, uma vez que identificam proteínas danificadas, degradadas pelo proteossoma e transformam-nas em pequenos polipeptídeos, ou seja, localizam a proteína modificada ativando-a ou desativando-a (Rechsteiner 2002; Hershko & Ciechanover 2003; Hanna *et al.* 2007). Quando as proteínas estão irreversivelmente danificadas/desnaturadas são degradadas por proteases intracelulares e permanentemente eliminadas por um processo chamado ubiquitinação (Hanna *et al.* 2007). Tanto as ubiquitinas como as HSP atuam de forma a reparar proteínas que sofreram desnaturação (Tomanek *et al.* 2011) e eliminando-as quando estas estão permanentemente danificadas

(Bond *et al.* 1988; Hanna *et al.* 2007). Assim, estes dois tipos de mecanismos de defesa ao *stress* ambiental complementam-se no seu modo de atuação. Quando as HSP não conseguem manter a conformação funcional das proteínas, as ubiquitinas atuam como segunda linha de defesa, removendo essas proteínas permanentemente (Bond *et al.* 1988; Sørensen *et al.* 2003b; Hanna *et al.* 2007).

1.4.3. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) constitui uma reação em cadeia dos ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, e é um dos processos mais frequentes que altera a permeabilidade, fluidez e integridade das membranas. A LPO desenvolve-se em três etapas, a iniciação, propagação e terminação (Yu 1994; Halliwell & Gutteridge 1999). Durante a fase de iniciação, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são oxidados pelos ROS através dos átomos de carbono que atacam as ligações duplas, convertendo a molécula lipídica em um radical lipídico (Repetto *et al.* n.d.; Sies & Cadenas 1985; Henkel & Solomon 2018; Lopes 2018). Posteriormente, este radical altamente instável, reage com o O₂ e origina peróxidos lipídicos, que por sua vez reagem com os lípidos vizinhos numa reação em cadeia, propagando assim o processo de peroxidação lipídica (Lopes 2018). A etapa final termina com a gênese de subprodutos da LPO, o malondialdeído (MDA), e hidrocarbonetos, tais como o etano e etileno (Freeman & Crapo 1982; Gutteridge & Halliwell 1990). Após os radicais livres reagirem com os ácidos gordos insaturados presentes nas membranas celulares, podem ocorrer danos celulares resultado da degradação oxidativa dos lípidos (Halliwell & Gutteridge 1999). As lesões celulares, resultam da reação entre o HO• e a membrana de lípidos (Sachdeva *et al.* 2014). Através de estudos anteriores, tais como Rosa *et al.* (2012; 2016), é possível constatar que as concentrações de MDA aumentam em algumas espécies marinhas com a temperatura, respetivamente, nos *hatchlings* de *Loligo vulgaris* e no cérebro de juvenis do tubarão bamboo (*Chiloscyllium punctatum*) ocorrendo peroxidação lipídica. O mesmo acontece com os juvenis de robalo, à temperatura de 28°C, são suscetíveis ao *stress* térmico, formando MDA, como consequência do *stress* oxidativo (Vinagre *et al.* 2012).

1.4.4. Dano de ADN

Um desequilíbrio entre a produção e eliminação de ROS após exposição a fatores ambientais nocivos, pode causar para além de danos nas proteínas e lípidos, danos a nível dos ácidos nucleicos (Ghosh *et al.* 2017). A natureza dos danos incluiu principalmente a modificação das bases azotadas, “*deoxyribose oxidation*”, “*strand breakage*” e “*DNA protein cross-link*” (Ghosh *et al.* 2017). Entre os vários ROS, o OH é o mais importante gerando vários produtos das bases de ADN que incluem a hidroxilação da deoxyguanosina para formar 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) (Kasai 1997), um dos produtos mais representativo das modificações oxidativas do ADN (Wiseman & Halliwell 1996). Os danos observados no ADN induzidos pelo *stress* oxidativo podem incluir várias mutações genéticas, como por exemplo a modificação das bases azotadas G:C, a qual exemplifica um ataque oxidativo por ROS (Bandyopadhyay *et al.* 1999). Considerando que as

proteínas do proteoma são responsáveis pela reparação do genoma, alterações nestas proteínas chave, podem prejudicar e danificar a estrutura de ADN (Krisiko & Radman 2013; Gueranger *et al.* 2014). Em condições de elevado CO₂ ocorre danos de ADN, como foi observado no estudo de danos celulares nos tubarões recém-nascidos, *Chiloscyllium plagiosum*, onde estes animais foram expostos por 50 dias a uma concentração ~ 890 µatm de CO₂ (Lopes *et al.* 2018). O mesmo se verificou em condições de aumento de CO₂ e temperatura num estudo multigeracional o mesmo se verificou, a geração parental, não apresentou diferenças na concentração de danos de ADN, mas estes danos foram expressados nas gerações posteriores (Lopes *et al.* 2019).

1.5. Modelo biológico: O cavalo-marinho *Hippocampus reidi*

1.5.1. Biologia e Ecologia

Globalmente a família *Syngnathidae* (e.g. cavalos-marinhos, dragões marinhos, peixe cachimbo, *pipehorses*) está ameaçada pela intensa exploração comercial para fins medicinais e aquariofilia (Salin *et al.* 2005), perda de habitat (Olden *et al.* 2007) e *bycatch* (Vincent 1996), estando listados na “IUCN Red list of threatened species” e no apêndice II do CITES, e também em algumas listas regionais e nacionais de espécies ameaçadas (Vincent *et al.* 2011). Este declínio tem sido acentuado devido à degradação do seu habitat (estuários, pradarias marinhas, magais e corais) (Vincent 1996; Vincent *et al.* 1997; Olden *et al.* 2007); a “*bycatch*” (Vincent 1996) (Vincent 1996), e à sua exploração para fins medicinais tradicionais e aquariofilia (Vincent 1996; Vincent *et al.* 1997; Salin *et al.* 2005), o que ameaça a integridade das espécies desta família. Estas espécies habitam zonas costeiras onde a degradação do seu ambiente é mais intensa devido à atividade humana, ameaçando a sua integridade (Gristina *et al.* 2015). A ecologia destes peixes torna-os vulneráveis devido à sua baixa mobilidade (não permitindo a migração para locais mais favoráveis à sua sobrevivência), altas taxas naturais de mortalidade juvenil e devido à monogamia observada em várias espécies (quando um dos parceiros morre, o outro morre não acasala novamente) (Lourie *et al.* 1999; Vincent *et al.* 2011).

O *Hippocampus reidi*, Guinburg 1993, é uma espécie listada como “quase ameaçada” segundo o IUCN em 2017. Contudo, este estatuto pode não corresponder à realidade devido não só à falta de dados sobre a dinâmica das populações mas também devido à intensa diminuição da população ocorrida nos últimos 20 anos como consequência das ameaças criadas pelo homem (Vincent 1996; Vincent *et al.* 1997; Lourie *et al.* 1999; Costa-Neto 2000; Rosa *et al.* 2002). Esta espécie distribui-se ao longo do oceano Atlântico ocidental, desde a Carolina do Norte até ao Sul dos EUA, ao longo do mar das Caraíbas e ao longo da costa do Brasil (figura 6) (Lourie *et al.* 2004), vive em habitats costeiros (Foster & Vincent 2004), entre 6-20m da costa (Rosa *et al.* 2002).



Figura 6: Distribuição geográfica da população de *H. reidi*. Fonte: IUCN 2017

Estes animais são frequentemente encontrados entre os 15-55m abaixo da superfície, podendo ocorrer entre os 0,1-75m, em que frequentemente estão ancorados a algum tipo de substrato, tal como raízes dos mangais, ervas marinhas, macroalgas, cnidários, esponjas, gorgonias e corais (Dias & Rosa 2003; Jenouvrier *et al.* 2003; Lourie *et al.* 2004; Rosa *et al.* 2007; Giacometti, Mai, A, C, Loebmann 2009; Mai & Rosa 2009; Pastor Gutiérrez *et al.* 2011; Aylesworth *et al.* 2015). Estes peixes usam a sua cauda muscular de forma a ancorar e “prenderem-se” a objetos naturais e artificiais que lhes possam conferir de abrigo contra correntes fortes (e.g. durante o acasalamento) e camuflagem contra predadores durante a alimentação (Lourie *et al.* 1999).

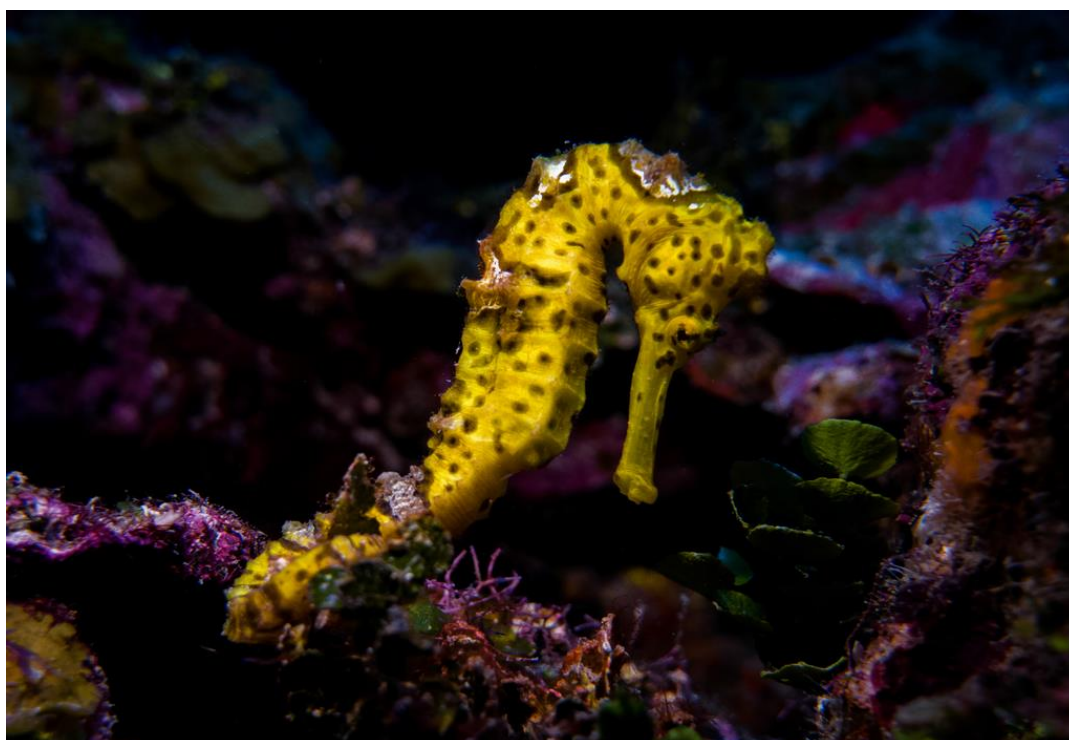


Figura 7: Indivíduo adulto da espécie *Hippocampus reidi*. Fonte: <https://www.inaturalist.org>

O *Hippocampus reidi* é especialmente ativo durante o dia, procurando abrigo de noite (Felício *et al.* 2006). Estes peixes alimentam-se principalmente de crustáceos tais como copépodes, calóides, ciclopóides, camarões carideanos, gamarídeos, anfípodes e nemátodos (Da Costa Castro *et al.* 2008). Contrariamente, os juvenis alimentam-se mais de insectos *Hymenopteran* e ovos de moluscos e crustáceos (Felício *et al.* 2006; Da Costa Castro *et al.* 2008). Os cavalos-marinhos em geral, não se aventuram na perseguição de presas, alimentam-se antes através da tática de “*sit and wait*” (Lourie *et al.* 2004). Estes cavalos-marinhos são geralmente solitários, mas podem ser vistos em pares, possivelmente com parceiros de acasalamento (Rosa *et al.* 2007). Pelo menos dentro do período reprodutivo estes animais são monogâmicos, uma vez que os machos apenas aceitam ovos de apenas uma fêmea de modo a aumentar o seu sucesso reprodutivo (Foster & Vincent 2004; Faleiro *et al.* 2015). O ritual de acasalamento caracteriza-se por uma “dança” ao longo da coluna de água, em que ambos se agarram mutuamente pelas caudas em movimentos paralelos, com a duração aproximada de 25 minutos (Rosa *et al.* 2007). Durante esta dança a fêmea, deposita os ovos na bolsa abdominal no macho, onde estes se desenvolvem durante 2 semanas (Vincent 1990). Após o período de gestação estes são expelidos durante horas, dando origem, em média, a 1000 a 1500 indivíduos de 7 mm de tamanho e com aparência de um cavalo-marinho juvenil (Vincent 1990). O período de reprodução estende-se ao longo de todo o ano, mas existe um pico entre Maio e Novembro, verificado no noroeste do Brasil (Mai & Velasco 2012). Nos estádios iniciais do seu ciclo de vida é quando se verifica uma maior taxa de mortalidade devido à maior predação, estando estes juvenis mais vulneráveis a peixes piscívoros e outros predadores (Foster & Vincent 2004).

1.5.2. Cavalos-marinhos e o impacto das alterações climáticas

A ecologia de vida destes animais torna-os particularmente sensíveis às alterações do seu habitat e à sobrepesca, sendo este o principal foco nos esforços para a sua conservação (Vincent *et al.* 2011). Devido à sua pobre capacidade de natação e pequena distribuição, a migração para áreas mais favoráveis é restrita (Aurélio *et al.* 2013; Faleiro *et al.* 2015). Aliás, a sua estratégia de camuflar e a vasta distribuição, aliada a habitats complexos, implica que nem todos os habitats são adequados às suas necessidades (Harasti *et al.* 2010; Hellyer *et al.* 2011). Adicionalmente, a fidelidade e os laços que forma com o parceiro (que lhes confere maior eficiência reprodutiva) significa que estes laços, quando quebrados, levam a que estes animais encontrem dificuldades em encontrar um novo parceiro, e mesmo que consigam encontrar, a sua reprodução pode ser afetada (Faleiro *et al.* 2015). Aliado a isto, o facto destes animais serem ovovivíparos implica que a sobrevivência destes juvenis esteja dependente da sobrevivência do macho (Foster & Vincent 2004). Dada a sua vulnerabilidade, derivada da sua ecologia, as alterações climáticas tendem a agravar o seu declínio mundialmente. O aquecimento dos oceanos leva a que as espécies procurem locais onde a temperatura seja mais favorável, o que não acontece com os cavalos-marinhos, apesar de se verificar que estes possuem alguma capacidade de migração (pequenas distâncias) segundo o estudo na Ria Formosa por Caldwell & Vincent 2012. A migração para estes animais origina impactos profundos no seu sucesso reprodutivo uma vez que o encontro com um novo parceiro pode não ocorrer (Faleiro *et al.* 2015).

O efeito combinado do aquecimento e acidificação dos oceanos demonstram ter um impacto no comportamento e ecologia dos cavalos-marinhos que combinado com as alterações profundas no seu habitat aumentam ainda mais a sua vulnerabilidade (Philippart *et al.* 2011; Aurélio *et al.* 2013; Faleiro *et al.* 2015). Segundo o estudo de Faleiro *et al.* (2015), os cavalos-marinhos adultos, da espécie *Hippocampus guttulatus*, demonstram estar preparados para suportar o aumento da temperatura dos oceanos, mas não quando expostos à combinação do aumento da temperatura e acidificação dos oceanos. Com o aumento da temperatura, o comportamento destes animais não se alterou, o que pode ser explicado pelo facto de estes peixes viverem em zonas intertidais, (ex. estuários) (Lourie *et al.* 2004) onde existem flutuações sazonais e diárias da temperatura. Embora os cavalos-marinhos adultos demonstrem uma grande resiliência a temperaturas elevadas, o mesmo pode não ocorrer em juvenis. Quando expostos a temperaturas elevadas (superiores a 28°C) (Aurélio *et al.* 2013) fora do seu limite de tolerância, o seu *fitness* e o seu sucesso de sobrevivência podem ficar comprometidos devido à deficiência de oxigénio (Pörtner *et al.* 2004; Portner *et al.* 2005) dado que o aumento da temperatura diminui a disponibilidade deste composto. Adicionalmente, a subida da temperatura aumenta as taxas metabólicas que por sua vez aumentam as taxas de alimentação (Faleiro *et al.* 2015). Embora as taxas de alimentação aumentem, este aumento não consegue ser suficiente face ao incremento da taxa metabólica, ficando a sobrevivência do animal em causa. Em condições de acidificação e aquecimento dos oceanos, as suas taxas de ventilação, de alimentação e atividade diminuem (Faleiro *et al.* 2015). Contrariamente, em situação de hipercapnia as taxas de ventilação dos peixes aumentam (Ishimatsu *et al.* 2004), revelando um desequilíbrio acido-base (Faleiro *et al.* 2015). Devido a este *stress*, o organismo coloca alguns processos inerentes em *standby*, como a produção de energia, para priorizar a sua sobrevivência (Aurélio *et al.* 2013). Um exemplo é o caso da síntese proteica, que tem um elevado custo de energia e que sofre uma diminuição significativa, de forma a “desviar” energia para outros processos cruciais (Guppy & Withers 1999; Boutilier 2001; Rosa & Seibel 2008, 2010). Esta supressão metabólica compromete o desenvolvimento normal do organismo e aumenta a sua vulnerabilidade a outros perigos (ex. predação, fome e doenças) (Portner & Knust 2007; Wang & Overgaard 2007).

1.5.3. Conservação dos cavalos-marinhos

A conservação dos cavalos-marinhos, como a de outras espécies, está dependente de abordagens interdisciplinares, devendo ser abordadas três temáticas, a sua pesca para fins de aquariofilia ou medicina tradicional (Vincent *et al.* 1997), o *bycatch* (Baum *et al.* 2003) e a degradação do seu habitat (Lockyear *et al.* 2006). Existe uma clara consciência da pesca comercial destes animais para fins de aquariofilia e medicina tradicional, mas grande parte da pesca destes animais é acidental. O controlo das artes de pescas, como a pesca de arrasto de fundo, poderia limitar a captura acidental dos cavalos-marinhos (Vincent 2011; Vincent *et al.* 2011). Como exemplo, cerca de 95% da captura destes animais resulta da pesca de camarão, que habita no mesmo tipo de habitat (Mcpherson & Vincent 2004; Baum & Vincent 2005; Giles *et al.* 2006; Martin-Smith & Vincent 2006; Perry *et al.* 2010). Além de partilharem o mesmo tipo de habitat, as malhas que são usadas para

capturar o camarão, não possibilita a fuga dos cavalos-marinhos. Para além destas ameaças, os cavalos-marinhos vivem nos habitats marinhos mais ameaçados do mundo, pradarias marinhas (Orth *et al.* 2006; Waycott *et al.* 2009), mangais (Valiella *et al.* 2006; Polidoro *et al.* 2010), recifes de coral (Wilkinson 2008), estuários (Blaber *et al.* 2000; Lotze *et al.* 2006) e macroalgas (Steneck *et al.* 2002; Airolti & Beck 2007). A poluição e as alterações climáticas são dos problemas mais recorrentes, alterando a qualidade da água e destruindo estes habitats e os organismos que neles habitam. Por este motivo, é necessário minimizar os efeitos das alterações climáticas através de mudanças nos hábitos do homem e da promoção da utilização de energias verdes, de modo a diminuir as emissões de CO₂ e outros compostos para de alguma forma ajudar na preservação e conservação da biodiversidade. Assim sendo é necessário priorizar a proteção onde existe riqueza destes animais e os seus habitats (Morgan & Vincent 2007), para que não entrem em declínio.

Uma medida de gestão a implementar para preservar esta espécie são as áreas marinhas protegidas (AMPs) (Samoilys *et al.* 2007; Yasue *et al.* 2010; Vincent *et al.* 2011), onde se pode impossibilitar qualquer tipo de arte de pesca que resulte na captura destes animais, de modo a proteger estes organismos e o seu habitat. As AMPs são uma medida política que serve para conservar e preservar os habitats de diversas espécies, melhorando a riqueza, número e a dimensão dos animais que nelas habitam (Leslie 2005; Lundquist & Granek 2005), e melhorar as comunidades marinhas adjacentes (Rowley 1994; Gerber *et al.* 2003; Mumby & Steneck 2008). Para a conservação de qualquer espécie é necessário haver um conhecimento prévio sobre as mesmas. Uma monitorização constante destes organismos marinhos e estudos de impacto ambiental mais concisos são necessários de forma a serem implementadas medidas mais precisas e que possibilitam a prosperidade, neste caso, não só das populações de cavalos-marinhos, como o seu habitat e a comunidade envolvente.

2. Objetivos

O objetivo principal desta dissertação foi o de avaliar o efeito das alterações climáticas, nomeadamente o aumento da temperatura (29°C) e diminuição do pH (pH=7,5) nas respostas fisiológicas dos juvenis, *Hippocampus reidi*. Mais especificamente, pretendeu-se aqui verificar quais as respostas ao *stress* oxidativo, avaliando i) a capacidade de defesa antioxidante através da quantificação de proteínas de choque térmico (HSP) e ubiquitinas; e ii) os possíveis danos celulares, através da determinação da peroxidação lipídica e danos de ADN.

3. Materiais e métodos

3.1. Aclimação dos indivíduos

Os indivíduos juvenis de cavalos-marinhos tropicais, *Hippocampus reidi*, foram obtidos a partir de adultos mantidos em cativeiro na empresa *Lusoreef*, Algarve. Após os machos libertarem os juvenis da bolsa, estes foram aclimatados durante um mês nas instalações da empresa a quatro diferentes tratamentos experimentais

representativos de aquecimento (+3°C) e acidificação ($\Delta\text{pH} = -0.5$, $\sim 1000\mu\text{atm}$) dos oceanos previstos para o final do século (tabela I). Em cada um destes quatro tratamentos foram colocados 18 juvenis de *H. reidi*. Após a exposição, estes foram recolhidos, colocados imediatamente a seguir em azoto líquido e congelados a -80°C. Posteriormente, estas amostras foram devidamente acondicionadas e transportadas para as instalações do Laboratório Marítimo da Guia, Cascais e novamente armazenadas a -80°C.

Tabela I: Condições experimentais às quais os juvenis de os cavalos-marinhos, *H. reidi* foram expostos durante um mês.

Tratamentos	Temperatura	pH
Controlo	26°C	8,0 (~400 μatm)
Acidificação	26°C	7,5 (~1000 μatm)
Aquecimento	29°C	8,0 (~400 μatm)
Acidificação+ Aquecimento	29°C	7,5 (~1000 μatm)

3.2. Análise de biomarcadores de *stress* oxidativo

3.2.1. Preparação dos tecidos

Para este estudo, foram utilizados inicialmente seis indivíduos de cada tratamento, correspondendo a um total de 24 indivíduos. Cada um destes foi pesado (peso médio 0,2117mg) e colocado individualmente num microtubo (1,5 ml). Cada um dos indivíduos foi homogeneizado em 0,500 ml de tampão de homogeneização PBS (solução salina de tampão fosfato, 0,14 M NaCl, 2,7 mM KCL, 8,1 mM Na₂PO₄ a pH 7,3), com a ajuda de um moedor de vidro do tipo *Potter Elvehjem*. Posteriormente, a amostra foi centrifugada durante 20 min a 14000xg a 4°C, sendo utilizado o sobrenadante para as análises realizadas neste trabalho.

3.2.2. Proteínas de choque térmico (HSP)

Como a HSP70 é a mais produzida após a indução de um *stress* ambiental, foi por este motivo a quantificada neste trabalho. A concentração de HSP70 foi quantificada por um ensaio imune-enzimático (ELISA) adaptado de Njemini *et al.* 2005. Em que 50 μl do sobrenadante homogeneizado foi diluído em 250 μl de PBS, onde 50 μl de cada amostra previamente (1:5) foi adicionada a 96 poços de uma microplaca (Microloan 600, Greiner, Alemanha) e incubada durante a noite a 4°C. Posteriormente, a placa foi lavada 3x com PBS 0,5% Tween-20 e adicionou-se 100 μl de solução bloqueadora (1% BSA, albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich, EUA) a cada um dos poços, e incubou-se à temperatura ambiente por duas horas. Após isto, lavou-se novamente a placa (3x com 0,5% PBS Tween-20), adicionou-se 50 μl de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do anticorpo primário (HSP70/HSC70, Acris, USA)

a cada poço, e incubou-se a 4°C durante a noite. Na manhã seguinte, o anticorpo não ligante foi retirado da microplaca, repetindo-se o processo de lavagem, e adicionou-se 50µl de um anticorpo secundário numa concentração de 1 µgml⁻¹ do anticorpo secundário (“alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG, Fab specific, Sigma-Aldrich, USA”), incubando durante 2h à temperatura ambiente. Após outra lavagem, 100µl de substrato, (“SIGMA FASTTM p-Nitrophenyl phosphate tablets, Sigma-Aldrich, EUA”) foi adicionado a cada um dos poços e incubado 30 min à temperatura ambiente. A solução stop (50µl de 3N NaOH) foi adicionada a cada um dos poços e imediatamente a seguir leu-se a absorvância a 405 nanômetros (nm), num leitor de microplacas (“Asys UVM 340, Biochrom, EUA”). Os resultados obtidos foram divididos pela quantidade de proteína total da amostra determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e expressos em miligramas de proteína total.

3.2.3. Ubiquitinas

A quantificação de ubiquitinas foi também realizada através de um ensaio ELISA. Em cada poço da microplaca de 96 poços (Microlon 600, Greiner, Alemanha) foi adicionada 50 µl de amostra. A microplaca foi incubada durante a noite a 4°C, e após perfazer 24h, a microplaca foi lavada 3x utilizando PBS 0,5% de Tween-20. De seguida, adicionou-se 100 µl da solução bloqueadora (1% BSA em PBS) a cada poço, sendo as microplacas incubadas a 4°C durante a noite. Após este período, a microplaca foi lavada 3x, de forma a remover os anticorpos não ligantes, e adicionou-se 100µl de substrato (TMB/E, Temecula California, Merk milipore) e incubou-se durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 100 µl da solução stop (HCl 1M), e leu-se a absorvância a 415 nm, utilizando um leitor de microplacas (Asys UVM 340, Biochrom, EUA). Os resultados obtidos foram divididos pela quantidade de proteína total da amostra determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e expressa em miligramas de proteína total.

3.2.4. Peroxidação lipídica

O ensaio da peroxidação lipídica foi adaptado do protocolo de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Uchiyama & Mihara 1978), sendo quantificado o produto final específico do processo de degradação oxidativa dos lípidos, o MDA. O ácido tiobarbitúrico reage com o MDA, no qual produz um produto fluorescente, lido a 532 nm. Sendo assim, 5µl de cada amostra foram tratados com 12,5 µl de dodecilsulfato de sódio (SDS 8,1%), 93,5 µl de ácido tricloroacético (20%, pH 3,5) e 93,5µl de ácido tiobarbitúrico (1%), em microtubos (1,5 ml) devidamente identificados. A cada um dos microtubos (1,5 ml) adicionou-se 50,5 µl de água miliQ, e incubou-se os microtubos (1,5 ml) em água a ferver durante 10 min. Em seguida, foram colocados em gelo durante 3 min de forma a diminuir a sua temperatura. Posteriormente, 62,5 µl de água miliQ e 312,5 µl piridina n-butanol (15:1, v/v) foram adicionadas a cada um dos microtubos (1,5 ml) e centrifugados a 7000 rpm durante 5 min. De cada microtubos (1,5 ml) foi retirado 150 µl do sobrenadante e inserido nos poços da microplaca, na qual se leu a absorvância, a 405 nm, utilizando um leitor de microplacas (Asys UVM 340, Biochrom, EUA).

Os resultados obtidos foram divididos pela quantidade de proteína total da amostra determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e expressa em nanomoles por miligrama de proteína total (nmol/mg de proteína total)

3.2.5. Dano de ADN

O dano ADN (isto é, quebra da cadeia de ADN ou erros de emparelhamento de bases) foi quantificado de acordo com Shen *et al.* 2007 e Maclouf *et al.* 2012, por meio de ELISA, a partir da quantificação de um dos principais produtos de oxidação de ADN, o 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Em cada um dos poços de uma microplaca de 96 poços, adicionou-se 100 µl da amostra e esta foi posteriormente incubada a 4°C durante a noite. Aquando o dia seguinte, as placas foram lavadas 3x com PBS Tween-20, na qual adicionou-se 200 µl da solução bloqueadora (1% BSA em PBS, “Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, USA”) a cada um dos poços e incubou-se 90 min à temperatura ambiente. Lavou-se novamente, incubou-se novamente a microplaca durante a noite com 50 µl anticorpo primário (0,5µg ml⁻¹, “anti-OHdG, clone 15 a3, Sigma-Aldrich, Alemanha”). Em seguida, a microplaca foi lavada novamente, de forma a remover o anticorpo não ligante e incubou-se durante 90 min a 37°C, com 50µl de anticorpo secundário (1µg ml⁻¹, “alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG, Fab specific, Sigma-Aldrich, USA”). Repetiu-se a lavagem, e adicionou-se 50 µl de substrato (SIGMA FASTTM p-Nitrophenyl phosphate tablets, Sigma-Aldrich, EUA), incubando a microplaca à temperatura ambiente durante 30 min. A reação foi interrompida com 100µl da solução stop de NaOH 3M, e a absorvância lida a 405 nm com um leitor de microplacas (Asys UVM 340, Biochrom, EUA), em que os resultados foram expressos em ABS mg⁻¹ de proteína total.

3.3. Análise dos dados

Após a aferição dos dados, as análises estatísticas das variáveis definidas foram efetuadas com o software RStudio (Versão 1.1.456 - © 2009-2018 RStudio, Inc.). Todos os Modelos Lineares Generalizados (GLM) foram realizados para todas as variáveis com pH e a temperatura como fator. Inicialmente, os replicados foram incluídos nos modelos lineares mistos (GLMM) como “*random effect*” para todas as variáveis analisadas, de modo a considerar a potencial variabilidade do desenho experimental e dependência dentro deste fator. Contudo, estes efeitos aleatórios foram removidos dos modelos sempre que a quantidade de variação explicada foi menor do que 5%. A aferição do melhor modelo para cada variável analisada foi realizada através do cálculo de “*Akaike Information Crittrion (AIC)*”, onde, o melhor modelo escolhido foi aquele que obteve um menor valor de AIC. A família de distribuição Gamma foi utilizada para analisar o efeito do aquecimento e da acidificação dos oceanos na concentração de HSP, MDA, ubiquitinas e no dano DNA existente nos tecidos dos cavalos-marinhos *H. reidi*. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando “*p-value*” < α , $\alpha = 0,05$.

4. Resultados

4.1. Proteínas de choque térmico (HSP)

Os resultados das HSP analisadas nos tecidos dos cavalos-marinhos *H. reidi* podem ser visualizados na figura 7. A concentração de HSP foi significativamente afetada apenas pelo efeito combinado do aumento de temperatura e da acidificação dos oceanos ($p < 0,05$; GLM, família Gamma, para mais detalhes consultar a tabela suplementar III que está em anexo), ou seja, existiu uma maior produção destas proteínas neste tratamento. A combinação de aquecimento e acidificação dos oceanos aumentou significativamente a concentração de HSP do tratamento controlo de $0,34 \pm 0,12$ para $\sim 1,0 \pm 0,39 \mu\text{g}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína total. Contrariamente, não foram detetados efeitos significativos nem da temperatura nem da acidificação quando analisados individualmente ($p > 0,05$; GLM, família Gamma, para mais detalhes consultar a tabela suplementar III que está em anexo).

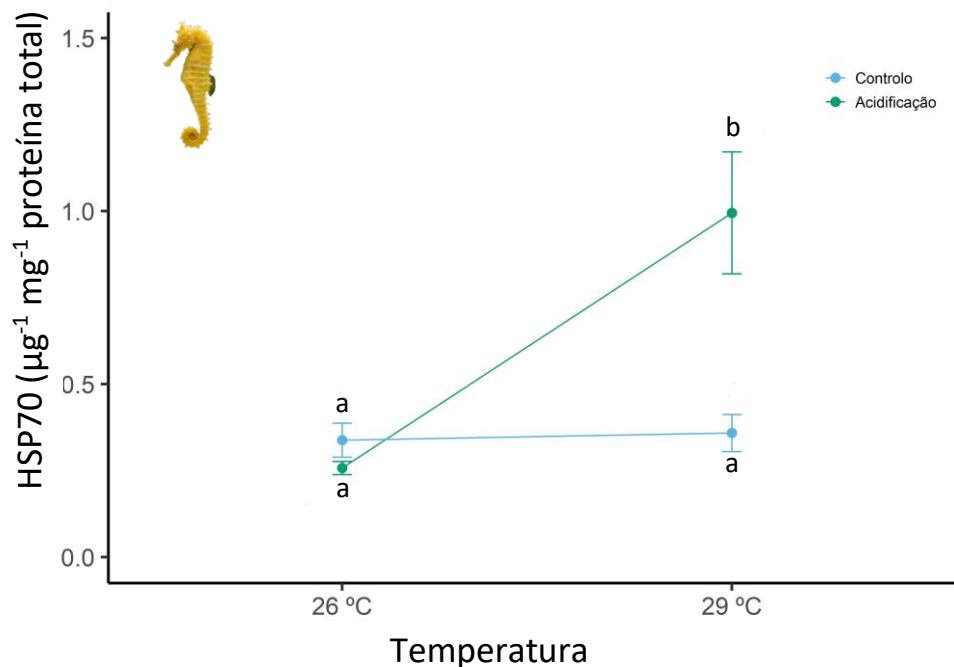


Figura 8: Efeito do aquecimento e acidificação dos oceanos na concentração de HSP70 nos tecidos da espécie de cavalo-marinho *H. reidi*. Os valores representam a média \pm desvio padrão (DP). A linha azul representa o tratamento experimental de controlo e a linha verde representa a acidificação. Sendo que as letras a e b representativas das diferenças estatísticas.

4.2. Ubiquitinas

Os resultados obtidos para as ubiquitinas analisadas nos tecidos dos cavalos-marinhos *H. reidi* podem ser observados na figura 8. A concentração de ubiquitinas demonstrou ser significativamente afetada ($p < 0,05$; GLM, família Gamma, para mais detalhes consultar a tabela suplementar III que está em anexo) quer pelo aumento da temperatura (29 °C) e diminuição do pH (pH 7,5), quer pela combinação de ambos os fatores. Ou seja, o efeito individual da temperatura e da combinação de ambos produziu alterações na concentração de

ubiquitina ($\mu\text{g}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{proteína}$) nos juvenis de cavalos-marinhos. O aumento da concentração de ubiquitinas com a temperatura foi superior nos tratamentos em hipercapnia de $0,05 \pm 0,01$ para $0,17 \pm 0,03 \mu\text{g}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{proteína}$, do que em normocapnia, de $0,01 \pm 0,009$ para $0,05 \pm 0,02 \mu\text{g}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ total.

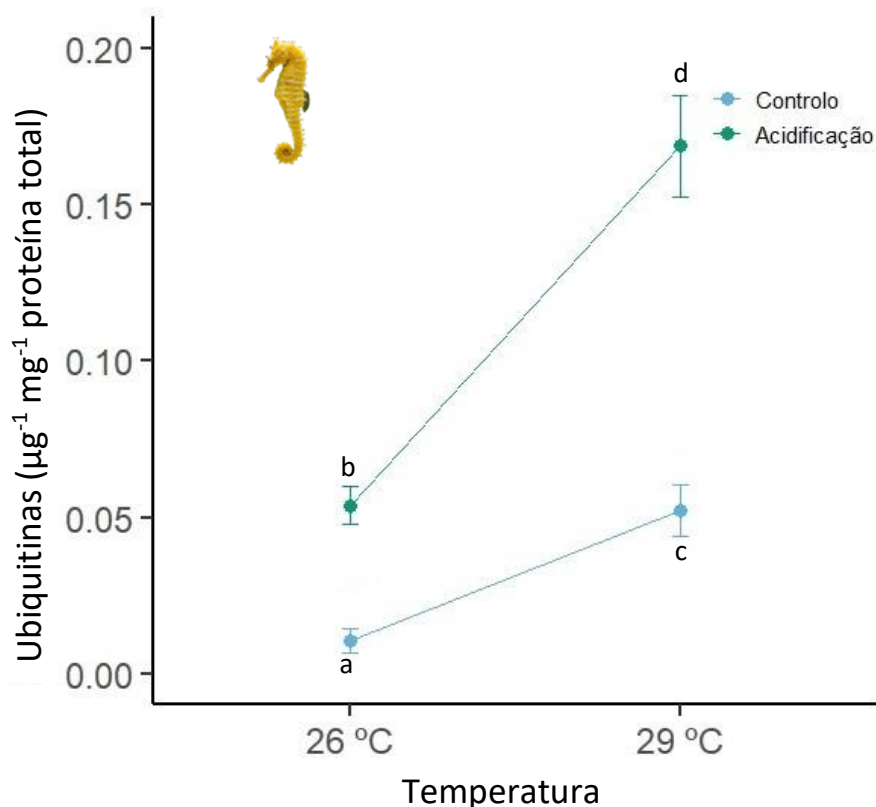


Figura 9: Efeito do aquecimento e acidificação dos oceanos na concentração de ubiquitinas nos tecidos da espécie de cavalo-marinho *H. reidi*. Os valores representam a média \pm DP. A linha azul representa o tratamento experimental de controlo e a linha verde representa a acidificação. Sendo que as letras a, b, c e d representativas das diferenças estatísticas.

4.3. Peroxidação lipídica

Os resultados obtidos para a peroxidação lipídica analisados nos tecidos dos cavalos-marinhos *H. reidi* foram investigados através da quantificação do malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais do processo de degradação oxidativa dos lípidos. Estes resultados podem ser observados na figura 9. A concentração de MDA foi significativamente afetada apenas pelo, efeito da acidificação ($p < 0,05$; GLM, família Gamma, para mais detalhes consultar a tabela suplementar I que está em anexo), contudo o efeito da temperatura e da combinação de ambos fatores não foi significativo ($p > 0,05$; GLM, família Gamma, para mais detalhes consultar a tabela suplementar III que está em anexo). Embora se tenha verificado um maior aumento da concentração de MDA em normocapnia de $0,006 \pm 0,001 \mu\text{M}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ para $0,008 \pm 0,001 \mu\text{M}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{proteína}$ com o aumento da temperatura, em hipercapnia este incremento foi praticamente nulo.

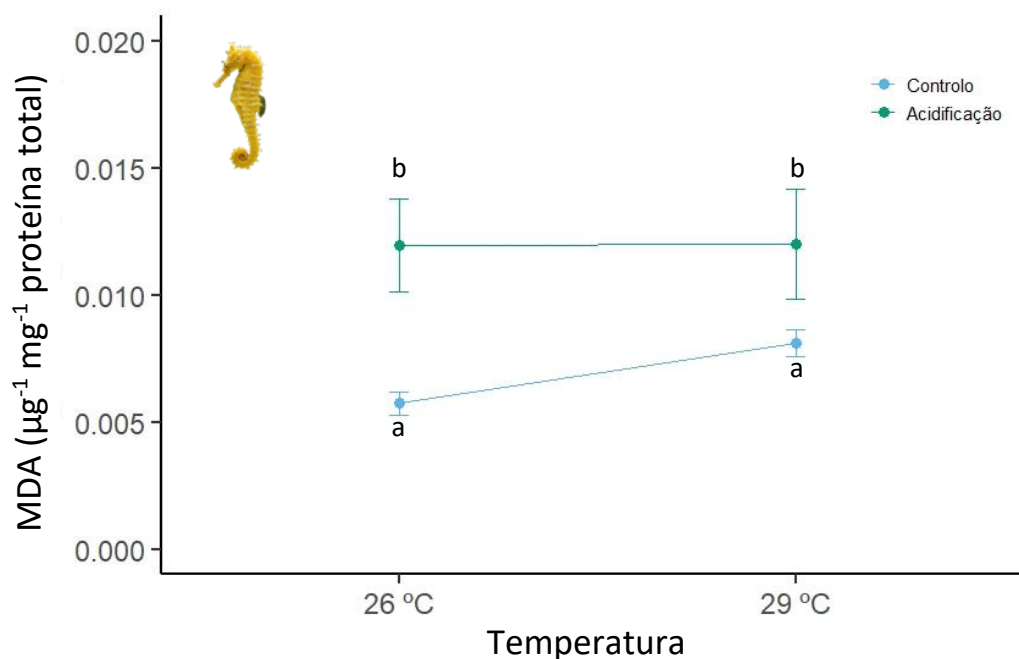


Figura 10: Efeito do aquecimento e acidificação dos oceanos na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm DP. A linha azul representa o tratamento experimental de controlo e a linha verde representa a acidificação. Sendo que as letras a e b representativas das diferenças estatísticas.

4.4. Dano de ADN

Foi detetado significativamente presença de dano ADN nos tecidos dos juvenis de cavalos-marinhos quando os estes organismos foram expostos ao efeito sinérgico do aumento da temperatura e diminuição do pH ($p < 0,05$; GLM, família Gamma, para mais detalhes consultar a tabela suplementar III que está em anexo). Com o efeito combinado de ambos os fatores, verificou-se um incremento significativo de $0,18 \pm 0,04$ no tratamento controlo para $0,23 \pm 0,07$ ABS mg^{-1} proteína total no tratamento da combinação da temperatura e acidificação.

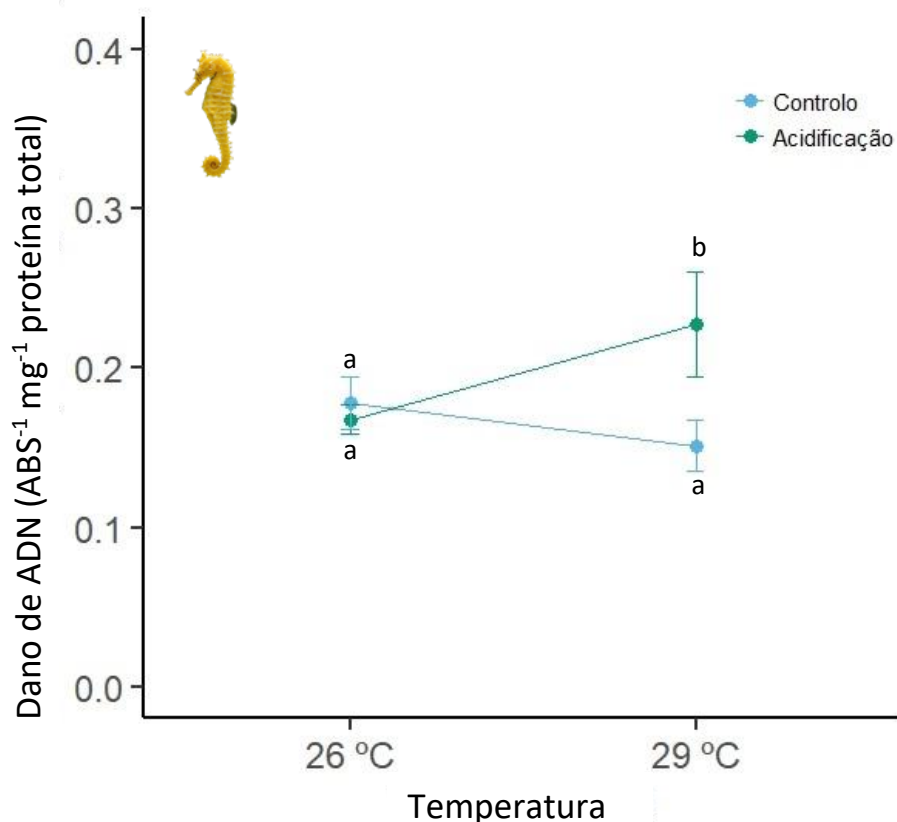


Figura 11: Efeito do aquecimento e acidificação dos oceanos na concentração de ADN. Os valores representam a média \pm DP. A linha azul representa o tratamento experimental de controlo e a linha verde representa a acidificação. Sendo que as letras a e b representativas das diferenças estatísticas.

5. Discussão

Globalmente, as populações de cavalos-marinhos enfrentam atualmente graves ameaças devido à sobre-exploração comercial para fins medicinais e aquariofilia, à captura acessória em artes de pesca (*by-catch*) e poluição. Contudo, o seu principal declínio em todo o mundo deve-se à degradação e alteração dos seus habitats. As características únicas destes peixes tornam-nos particularmente sensíveis e vulneráveis à exploração e a perturbações do seu ambiente natural e, por isso, num cenário de alterações climáticas estes organismos podem ter uma limitada capacidade para rapidamente adaptarem-se às futuras mudanças dos oceanos. Naturalmente, os organismos marinhos estão expostos a uma grande variedade de flutuações ambientais em diferentes escalas temporais e espaciais, de polar para tropical e de horas a sazonal (Lesser 2006), e a fim de manter a sua homeostase para poderem crescer e reproduzir-se possuem uma série de mecanismos regulatórios, tais como resposta ao choque térmico e defesa antioxidante (Lesser 2011; Abele, Vazquez-Medina 2012), de forma a modificarem as suas estruturas celulares para se protegerem (Choresch *et al.* 2004; Hofmann 2005).

Os organismos marinhos quando expostos a um *stress* ambiental, tal como o aumento da temperatura, diminuição do pH, radiação ultravioleta, e/ou contaminação, sofrem uma superprodução de ROS (Gerschman *et al.* 1954; Cadenas 1989), e quando a sua produção e acumulação excede a capacidade do organismo em

remover estas moléculas, pode ocorrer *stress* oxidativo (Sies 1993; Halliwell 1994; Ahmed 2005). Em condições normais, todos os organismos aeróbios enfrentam a necessidade de lidar com a produção de ROS, pois estas são moléculas quimicamente reativas que contêm oxigênio, e são um produto natural do metabolismo de oxigênio, tendo papéis importantes na sinalização celular e homeostasia (Cadenas 1989). Embora os organismos apresentem naturalmente um conjunto de mecanismos antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), bem como mecanismos de reparação e remoção de proteínas, de forma a contrabalançar a produção de ROS a fim de evitar o *stress* antioxidante e consequentemente o dano oxidativo (Lushchak 2011), com as alterações climáticas poderá haver uma produção excessiva de ROS, a concentrações superiores à ocorrência em situações naturais. Tal poderá aumentar a frequência da produção de *stress* oxidativo (Lesser 2006), comprometer as respostas antioxidantes (Lopes *et al.* 2018), e consequentemente o normal desenvolvimento e fisiologia dos organismos.

Uma das repostas moleculares que é ativada na célula quando os organismos são expostos ao aumento da temperatura e acidificação dos oceanos é a produção das proteínas de choque térmico (HSP), uma ativação genética que ocorre nas células em resposta ao *stress* de ambiental (Hofmann 2005; Cummings *et al.* 2011). Estas proteínas fazem parte das defesas antioxidantes, na qual tem um importante papel na manutenção do proteoma, na reparação de proteínas desnaturadas e na remoção de proteínas danificadas, controlando a formação de ROS. Durante a exposição dos juvenis de *Hippocampus reidii* à combinação de aumento da temperatura e acidificação dos oceanos, foi observado que os níveis de HSP70 aumentaram, o que revela uma regulação positiva da defesa antioxidante contra possíveis danos oxidativos e para proteger a integridade celular. Contudo, individualmente tanto o efeito do aumento da temperatura e diminuição do pH, diminuíram a concentração de HSPs, ou seja, houve uma inativação dos mecanismos de reparação e *refold* de proteínas pelas HSP, em situação de “aquecimento” e acidificação, aumentando o dano proteico. Quando as proteínas alcançam um nível de desnaturação em que a sua recuperação já não é possível, ocorre a síntese de ubiquitinas. O que está de acordo com os resultados obtidos, em que a concentração destas aumentou significativamente com o aquecimento e acidificação dos oceanos, tanto individualmente como combinadamente. As ubiquitinas, como marcador de dano proteico, têm a capacidade de detetar proteínas irreversivelmente danificadas para que possam ser posteriormente e permanentemente eliminadas (Bond *et al.* 1988; Hanna *et al.* 2007). Tanto os resultados observados das HSP como das ubiquitinas, indicam que houve uma inativação dos mecanismos de reparação e *refold* de proteínas pelas HSP, em situação de “aquecimento” e acidificação, aumentando o dano proteico e consequentemente a eliminação pelas ubiquitinas, dado que estes dois mecanismos são complementares (Finley *et al.* 1984; Alberti *et al.* 2002). Com isto, as HSP não conseguiram reparar as proteínas danificadas, quer no tratamento de “aquecimento” quer no tratamento de acidificação, como no efeito sinérgico. Apesar de haver uma clara significância no tratamento sinérgico referente à produção de HSP, estas não foram suficientes para responder ao *stress*, havendo a atuação da segunda linha de defesa, as ubiquitinas. Quando estas respostas antioxidantes não conseguem fazer face ao aumento do *stress* oxidativo, podem ocorrer danos celulares tais como a peroxidação lipídica e danos de ADN (Lopes *et al.* 2013; Halliwell & Gutteridge 1999; González *et al.* 2015).

A peroxidação lipídica é uma das lesões celulares mais frequentes, especialmente aquelas associadas à membrana (Lesser 2011). Quando as defesas antioxidantes não conseguem desintoxicar o organismo dos ROS pode haver um aumento da formação do MDA que é um dos produtos da degradação da peroxidação lipídica (Uchiyama & Mihara 1978; Pannunzio & Storey 1998). Através dos resultados obtidos podemos observar a ocorrência de dano celular com a diminuição do pH, repercussão do aumento de MDA nos tecidos dos juvenis de *H. reidi*. A resposta antioxidante das ubiquitinas aqui analisada, indica que nos três tratamentos esta não foi suficiente, dado que ocorreu peroxidação lipídica com a diminuição do pH. Considerando que o proteoma é responsável pela reparação, replicação e expressão do genoma, ao se afetarem proteínas chave, o *stress* ambiental pode também provocar danos no ADN, prejudicando a sua estrutura (Krisiko & Radman 2013a; Gueranger *et al.* 2014b). Através dos resultados obtidos, verificou-se a presença de dano de ADN quando os juvenis de cavalos-marinhos foram expostos à combinação do aumento temperatura e diminuição de pH. Este aumento de dano do ADN poderá estar correlacionado com o aumento dos níveis de ubiquitinas, sendo este biomarcador um indicador de dano celular, dado que o proteoma está intrinsecamente relacionado com a qualidade do genoma de um indivíduo (Krisiko & Radman 2013b; Gueranger *et al.* 2014). Como os mecanismos de reparação do ADN envolvem proteínas chave que atuam de forma a evitar “*strand breaks*” e incompatibilidade de pares de bases azotadas (Hoeijmakers 2009; Yngve *et al.* 2009) o dano proteico limita a eficiência do proteoma de reparar quaisquer danos no ADN (Montaner *et al.* 2007; Polo & Jackson 2011; Krisiko & Radman 2013a; Peacock *et al.* 2014).

Vários estudos revelam que a expressão das proteínas de *stress* tem um custo energético (Sørensen *et al.* 2003), reduzindo por exemplo as taxas de crescimento dos organismos (Davies 1999). Os custos desta indução são causados pela elevada energia necessária para a produção de proteínas de *stress* e os efeitos negativos das concentrações elevadas das proteínas de *stress* que atuam segundo a sua função catabólica (Feder & Hofmann 1999; Sørensen *et al.* 2003). Com as alterações climáticas prevê-se que a demanda energética para os organismos enfrentarem situações de *stress*, como o experienciado neste trabalho, será maior (e.g. Rosa *et al.* 2012; Teixeira *et al.* 2013; Faleiro *et al.* 2015; Pimentel *et al.* 2015). Como os cavalos-marinhos também habitam zonas intertidais, onde ocorrem rápidas flutuações das características químicas e físicas devido ao ciclo de marés, estes animais vivem perto do seu limite térmico, o que significa, que uma exposição prolonga a temperaturas e pH nunca antes experienciados irá acarretar custos ao animal. Nos juvenis esta situação é ainda mais gravosa, dada a sua fase inicial de vida, a energia produzida deveria ser utilizada para o seu crescimento, mas face a estas alterações, esta energia é direcionada para outros processos, como a síntese de defesas antioxidantes de forma a não ocorra *stress* oxidativo. Esta demanda metabólica compromete o normal desenvolvimento do organismo e aumenta não só a sua vulnerabilidade a outros perigos, como doenças e predação, como põe em causa a sua própria sobrevivência.

6. Conclusões e perspectivas futuras

Com o presente estudo, verificou-se que os juvenis do cavalo-marinho *H. reidi* serão afetados com as futuras alterações climáticas. Sendo que as respostas defensivas, as respostas antioxidantes, não foram capazes de “combater” os danos celulares na sua totalidade. Os efeitos combinados da temperatura e pH, provocaram *stress* oxidativo nestes organismos, de forma que foram desencadeados mecanismos de defesa, tais como as HSP e ubiquitinas. Através dos resultados obtidos confirma-se que a capacidade de resposta pelas HSP não foi suficiente, no efeito isolado da temperatura e pH, sendo que ocorreu a atuação das ubiquitinas como segunda linha de defesa. Mesmo assim, esta resposta antioxidante não foi eficiente com a diminuição do pH, ocorrendo a produção de MDA, que é um produto da peroxidação lipídica. Para além deste dano, com o efeito sinérgico a resposta antioxidante não impediu ocorrência de dano de ADN. A ativação constante das respostas defensivas a *stresses* acarreta custos metabólicos, diminuindo a energia disponível para outros processos, como normal desenvolvimento, crescimento e reprodução (Frommel *et al.* 2014; Pimentel *et al.* 2014, 2015; Silva *et al.* 2016; Stiasny *et al.* 2016). A longo prazo a exposição a tais alterações ambientais, põe em causa a sobrevivência dos organismos e da espécie, sendo importante perceber como as alterações climáticas poderão alterar processos biológicos chave, de forma a alertar para esta temática, e reproduzir respostas mais rápidas pela comunidade geral e governamental.

Este trabalho mostra a importância dos biomarcadores de *stress* oxidativos e a sua resposta face às alterações climáticas, tendo uma relevância importante para o ambiente e estudos de monitorização. Por isso mesmo é necessário não só estudos que demonstrem as alterações ambientais às quais os cavalos-marinhos estarão sujeitos, como estudos multigeracionais, de forma a se compreender quais os impactos sobre as populações a longo prazo. Como também, mais estudos referentes aos juvenis, dado que estes são muito mais sensíveis às alterações ambientais, e o futuro das populações.

7. Referencias bibliográficas¹

- Abele D, Vazquez-Medina JP, Zenteno-Savin T, 2012. Oxidative Stress in Aquatic ecosystems. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, **11**: 158-161.
- Ahmed R. 2005. Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, **15**: 2.
- Airoldi L, Beck MW. 2007. Loss, status and trends for coastal marine habitats in Europe. *Oceanography and Marine Biology, Annual Review*, **45**: 345-405.
- Alberti S, Demand J, Esser C, Emmerich N, Schild H, Höhfeld J. 2002. Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(48): 45920-45927.
- Alheit J, Bakun A. 2010. Population synchronies within and between ocean basins: Apparent teleconnections and implications as to physical–biological linkage mechanisms. *Journal of Marine Systems* **79**:267–285.
- Anacleto P, Maulvault AL, Lopes VM, Repolho T, Diniz M, Nunes ML, Marques A, Rosa R. 2014. Ecophysiology of native and alien-invasive clams in an ocean warming context. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, **175**: 28-37.
- Angilletta MJ, Oufiero CE, Leaché AD. 2006. Direct and indirect effects of environmental temperature on the evolution of reproductive strategies: An information-theoretic approach. *American Naturalist*, **168**(4):123-135.
- Atidia J, Kulka RG. 1982. Formation of conjugates by 125I-labelled ubiquitin microinjected into cultured hepatoma cells. *FEBS Letters*, **142**(1):6-72.
- Aurélio M, Faleiro F, Lopes VM, Pires V, Lopes AR, Pimentel MS, Repolho T, Baptista M, Narciso L, Rosa R. 2013. Physiological and behavioral responses of temperate seahorses (*Hippocampus guttulatus*) to environmental warming. *Marine Biology* **160**:2663–2670.
- Aylesworth LA, Xavier JH, Oliveira TPR, Tenorio GD, Diniz AF, Rosa IL. 2015. Regional-scale patterns of habitat preference for the seahorse *Hippocampus reidi* in the tropical estuarine environment. *Aquatic Ecology*, **49**(4):499-512.
- Bakthisaran R, Tangirala R, Rao CM. 2015. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1854**(4):291-319.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, **77**(5):658-666.

¹ As referências bibliográficas seguem as regras da revista *Conservation Biology*

- Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, Welch WJ. 1988. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science*, **241**(4874):1817-20.
- Basile M, Christos O, Andreas P, Hans OP. 2005. Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, **293**:109-118.
- Baum JK, Meeuwig JJ, Vincent ACJ. 2003. Bycatch of lined seahorses (*Hippocampus erectus*) in a Gulf of Mexico shrimp trawl fishery. *Fishery Bulletin*, **101**(4): 721-731.
- Baum JK, Vincent ACJ. 2005. Magnitude and inferred impacts of the seahorse trade in Latin America. *Environmental Conservation*, **32**(4): 305-319.
- Baumann H, Talmage SC, Gobler CJ. 2012. Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. *Nature Climate Change*, **2**:38-41.
- Blaber SJM, Cyrus DP, Albaret JJ, Ching CV, Day JW, Elliott MS, Fonseca MS, Hoss DE, Orensanz J, Potter IC, Silvert W. 2000. Effects of fishing on the structure and functioning of estuarine and nearshore ecosystems. *Page ICES Journal of Marine Science*, **57**(3):590-602.
- Bond U, Agell N, Haas AL, Redman K, Schlesinger MJ. 1988. Ubiquitin in stressed chicken embryo fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **263**:2384–2388.
- Boutilier RG. 2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *The Journal of experimental biology*, **204**:3171-3181.
- Brierley AS, Kingsford MJ. 2009. Impacts of Climate Change on Marine Organisms and Ecosystems, *Current Biology* **19**(14):602-614
- Byrne M, Przeslawski R. 2013. Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates life histories. *Integrative and Comparative Biology*, **53**(4):582-596.
- Cadenas E. 1989. Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annual Review of Biochemistry* **58**:79–110.
- Caldeira K, Wickett ME. 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, **425**:365.
- Caldwell IR, Vincent ACJ. 2012. A sedentary fish on the move: Effects of displacement on long-snouted seahorse (*Hippocampus guttulatus*) movement and habitat use. *Environmental Biology of Fishes* **96**:67–75.
- Chin DT, Kuehl L, Rechsteiner M. 1982. Conjugation of ubiquitin to denatured hemoglobin is proportional to the rate of hemoglobin degradation in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **79**:61-5857.

- Choo KS, Snoeijs P, Pedersén M. 2004. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **298**:111-123.
- Choresh O, Loya Y, Müller WEG, Wiedenmann J, Azem A. 2004. The mitochondrial 60-kDa heat shock protein in marine invertebrates: Biochemical purification and molecular characterization. *Cell Stress and Chaperones*. **9**(1):38-48.
- CO2.Earth. 2019. <https://pt.co2.earth/>
- Costa-Neto EM. 2000. Zotherapy based medicinal traditions in Brazil. *Honey Bee* **11**:2–4.
- Costanza, Robert, Arge, Ralph, deGroot, Rudolf, Farberk, Stephen, Grasso, Monica, Hannon, Bruce, Limburg, Karin, Naeem, Shahid, Neill, Robert V O, Paruelo, Jose, Raskin, Robert G, and Sutton P. 1997. The value of the world ' s ecosystem services and natural capital. *Nature*, **387**:253-260.
- Cummings V, Hewitt J, Van Rooyen A, Currie K, Bread S, Thrush S, Norkko J, Barr N, Heath P, Halliday NJ, Sedcole R, Gomez A, McGraw C, Metcalf V. 2011. Ocean acidification at high latitudes: Potential effects on functioning of the antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *PLoS ONE*, **6**(1):1609
- Da Costa Castro AL, De Farias Diniz A, Martins IZ, Vendel AL, De Oliveira TPR, De Lucena Rosa IM. 2008. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: *Syngnathidae*) as a study-case. *Neotropical Ichthyology*, **6**(4):637-644.
- David E, Tanguy A, Pichavant K, Moraga D. 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal*, **272**(21):52-5635.
- Davies KJA. 1999. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: A new paradigm for oxidative stress, *IUBMB life*,**48**(1):7-41.
- de Pomerai DI. 1996. Review : Heat-shock proteins as biomarkers of pollution. *Human & Experimental Toxicology* **15**:279–285.
- Delaney MA, Klesius PH. 2004. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, **236**:633-644.
- Dias TL, Rosa IL. 2003. Habitat preferences of a seahorse species, *Hippocampus reidi* (Teleostei: *Syngnathidae*) in Brazil. *Aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology* **6**:165-176.
- Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA. 2009. Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem. *Annual Review of Marine Science* **1**:169–192.

- Dong Y, Miller LP, Sanders JG, Somero GN. 2008. Heat-shock protein 70 (Hsp70) expression in four limpets of the genus *Lottia*: Interspecific variation in constitutive and inducible synthesis correlates with in situ exposure to heat stress. *Biological Bulletin*, **215**(2):81-173.
- Fabry VJ, Seibel B a., Feely RA, Orr JC. 2008. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science* **65**:414–432.
- Faleiro F, Baptista M, Santos C, Aurélio ML, Pimentel M, Pegado MR, Paula JR, Calado R, Repolho T, Rosa R. 2015. Seahorses under a changing ocean: The impact of warming and acidification on the behaviour and physiology of a poor-swimming bony-armoured fish. *Conservation Physiology*,**3**:1-77.
- Falkowski P, Scholes RJ, Boyle, E, Canadell J, Canfield J, Elser J, Gruber N. 2000. The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science. American Association for the Advancement of Science*, **290**:291–296..
- Feder ME, Hoffman GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61**:243–282.
- Feely RA, Byrne RH, Acker JG, Betzer PR, Chen CTA, Gendron JF, Lamb MF. 1988. Winter-summer variations of calcite and aragonite saturation in the Northeast Pacific. *Marine Chemistry* **25**:227-241.
- Feely RA, Sabine CL, Lee K, Berelson W, Kleypas J, Fabry VJ, Millero FJ. 2004. Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science*, **305**(5682):6-362.
- Felício AKC, Rosa IL, Souto A, Freitas RHA. 2006. Feeding behavior of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933. *Journal of Ethology*, **24**(3):219-255.
- Field JG, Hempel G, Summerhayes CP. 2013. *Oceans 2020: Science, Trends, and the Challenge of Sustainability*. Island Press **16**(4):109.
- Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A. 1984. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**:43–55.
- Fonseca VF, França S, Serafim A, Company R, Lopes B, Bebianno MJ, Cabral HN. 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquatic Toxicology*, **10**(3-4):27:216.
- Foster SJ, Vincent ACJ. 2004. Life history and ecology of seahorses: Implications for conservation and management. *Journal of fish Biology*, **65**(1).
- Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **47**(5):26:412.

- Freire CA, Welker AF, Storey JM, Storey KB, Hermes-Lima M. 2011. Oxidative Stress in Estuarine and Intertidal Environments (Temperate and Tropical). In: Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems, Abele D, Zenteno-Savín T, Vazques-Medina J (Eds). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 41-57.
- Frommel AY, Maneja R, Lowe D, Pascoe CK, Geffen AJ, Folkvord A, Piatkowski U, Clemmesen C. 2014. Organ damage in Atlantic herring larvae as a result of ocean acidification. *Ecological Applications*, **24**(5):43-1131.
- Gattuso J-P, Buddemeier RW. 2000. Calcification and CO₂. *Nature*, Macmillan Magazines Ltd, **407**:311..
- Gattuso J-P, Frankignoulle M, Smith S V. 2002. Measurement of community metabolism and significance in the coral reef CO₂ source-sink debate. *National Academy of Sciences*, **96**(23):13017-103022.
- Gavilanes JG, Gonzalez de Buitrago G, Perez-Castells R, Rodriguez R. 1982. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a ubiquitin-like protein from insect eggs. *The Journal of biological chemistry* **257**:10267–70.
- Gerber LR, Botsford LW, Hastings A, Possingham HP, Gaines SD, Palumbi SR, Andelman S. 2003. Population models for marine reserve design: A retrospective and prospective synthesis. *Ecological Applications* **13**(1):47-64.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. 1954. Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science*, **119**(3097):6-623.
- Ghosh N, Das A, Chaffee S, Roy S, Sen CK. 2017. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. *Immunity and Inflammation in Health and Disease*, **77**:45–55.
- Giacometti, Mai, A, C, Loebmann D. 2009. Size and number of newborn juveniles in wild *Hippocampus reidi* broods. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, **4**:154–157.
- Giles BG, Ky TS, Hoang DH, Vincent ACJ. 2006. The catch and trade of seahorses in Vietnam. *Biodiversity and Conservation*, **15**(8):2497-2513.
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *National Academy of Sciences, USA*, **72**:11–5.
- González PM, Malanga G, Puntarulo S. 2015. Cellular Oxidant/Antioxidant Network: Update on the Environmental Effects Over Marine Organisms. *The Open Marine Biology Journal*, **9**:1–13.
- Gregg WW, Conkright ME, Ginoux P, O'Reilly JE, Casey NW. 2003. Ocean primary production and climate: Global decadal changes. *Geophysical Research Letters*, **30**(15):94-8276.
- Gristina M, Cardone F, Carlucci R, Castellano L, Passarelli S, Corriero G. 2015. Abundance, distribution and

habitat preference of *Hippocampus guttulatus* and *Hippocampus hippocampus* in a semi-enclosed central Mediterranean marine area. *Marine Ecology*, **36**:57–66.

- Gueranger Q, Li F, Peacock M, Larnicol-Fery A, Brem R, Macpherson P, Egly J-M, Karran P. 2014a. Protein Oxidation and DNA Repair Inhibition by 6-Thioguanine and UVA Radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, **134**:1408–1417.
- Gueranger Q, Li F, Peacock M, Larnicol-Fery A, Brem R, Macpherson P, Egly JM, Karran P. 2014b. Protein oxidation and DNA repair inhibition by 6-thioguanine and UVA radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, **134**(5):1408-1417.
- Guppy M, Withers P. 1999. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **74**:1–40.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Biochemical Sciences*, **15**(4):129-135.
- Guttman SD, Glover CVC, Allis CD, Gorovsky MA. 1980. Heat shock, deciliation and release from anoxia induce the synthesis of the same set of polypeptides in starved *T. pyriformis*. *Cell*, **23**(1):73-77.
- Hahn GM, Li GC. 1982. Thermotolerance and Heat Shock Proteins in Mammalian Cells. *Radiation Research*, **92**:452–457.
- Hallett J. 2002. *Climate change 2001: The scientific basis*. Edited by J. T. Houghton, Y. Ding, D. J. Griggs, N. Noguer, P. J. van der Linden, D. Xiaosu, K. Maskell and C. A. Johnson. 2001. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, **128**:1038–1039. John Wiley & Sons, Ltd.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, **344**(8924):4-721.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Science Publication, 5th edition, New York.
- Hanna J, Meides A, Zhang DP, Finley D. 2007. A Ubiquitin Stress Response Induces Altered Proteasome Composition. *Cell*, **129**:747–759.
- Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW, Medina-Elizade M. 2006. Global temperature change. *National Academy of Sciences*, **103**:14288–14293.
- Harasti D, Glasby TM, Martin-Smith KM. 2010. Striking a balance between retaining populations of protected seahorses and maintaining swimming nets. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **20**(2):159-166.

- Harley CDG, Hughes AR, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS, Rodriguez LF, Tomanek L, Williams SL. 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, **9**:228–241.
- Hellyer CB, Harasti D, Poore AGB. 2011. Manipulating artificial habitats to benefit seahorses in Sydney Harbour, Australia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **21**:582-589.
- Henkel R, Solomon M. 2018.. A Clinician’s Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage. *Oxidative Stress*, A. Zini and A. Agarwal, editors, 179-195.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. the Ubiquitin System. *Annual Review Biochem*, **67**:425–79.
- Hershko A. 2002. The Ubiquitin System for Protein Degradation. *Annual Review of Biochemistry*, **61**:761–807.
- Hershko A, Ciechanover A. 2003. The Ubiquitin System for Protein Degradation. *Annual Review of Biochemistry*, **61**:761-807.
- Hochachka P, Somero G. 2002. *BioChemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*.
- Hoegh-Guldberg O, Mumby, PJ, Hooten AJ, Steneck, RS, Greenfield P, Gomez E. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, **318**(5857):1737-1742 .
- Hoegh-guldberg O. 2010. The Impact of Climate Change on the. *Ecological Research*, **1523**:1523–1529.
- Hoeijmakers JHJ. 2009. DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine*, **361**(15):85-1475.
- Hoffman JR, Hansen LJ, Klinger T. 2003. Interactions between UV radiation and temperature limit inferences from single-factor experiments. *Journal of Phycology*, **39**:268-272.
- Hofmann GE. 2005. Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Page Integrative and Comparative Biology*, **45**(2):55-247
- Hönisch B, Ridwell A, Schmidt DN, Thomas E, Gibbs SJ, Sluijs A, Zeebe R, Kump L, Martindale RC, Greene SE, Kießling W, Ries J, Zachos JC, Royer D, Barker S, Marchitto TM, Moyer R, Pelejero C, Ziveri P, Foster GL, Williams B. 2012. The Geological Record of Ocean Acidification. *Science, N.Y.*, **335**:1058–1063.
- Hu MY, Hwang PP, Tseng YC. 2015. Recent advances in understanding trans-epithelial acid-base regulation and excretion mechanisms in cephalopods. *Tissue Barriers*, **45**(2):247-255.
- IPCC. 2001. *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Climate Change 2001: The Scientific Basis.
- IPCC. 2007. *Climate Change 2007 Synthesis Report*. Page Intergovernmental Panel on Climate Change [Core

Writing Team IPCC.

IPCC. 2014. Climate change 2014: Synthesis report for policymakers. Page IPCC 5th Assessment.

Ishimatsu A, Hayashi M, Kikkawa T. 2008. Marine Ecology-Progress Series, **373**:295-302

Ishimatsu A, Kikkawa T, Hayashi M, Lee KS, Kita J. 2004. Effects of CO₂ on marine fish: Larvae and adults. Journal of Oceanography, **60**(4):731-741.

Jaattela M. 1993. Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. Journal of Experimental Medicine, **177**(1):6-231.

Jenouvrier S, Barbraud C, Weimerskirch H. 2003. Effects of climate variability on the temporal population dynamics of southern fulmars. Journal of Animal Ecology, **72**:576-587.

Karl TR, Trenberth KE. 2003. Modern Global Climate Change. Science **302**:1719–1723.

Kasai H. 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. Mutation Research - Reviews in Mutation Research, **387**(3):63-147.

Kennedy VS, Twilley RR, Kleypas JA, James H. Cowan J, Hare SR. 2002. Coastal and marine ecosystems & Global climate change. Page Environment, **31**:477–491

Kiehl JT, Trenberth KE, Kiehl JT, Trenberth KE. 1997. Earth's Annual Global Mean Energy Budget. Bulletin of the American Meteorological Society, **78**:197–208.

Kleypas J, Feely R, Fabry V, Langdon C, Sabine C, Robbins L. 2006. Impacts of Ocean Acidification on Coral Reefs and Other Marine Calcifiers : A Guide for Future Research. Page Impacts of Ocean Acidification on Coral Reefs and Other Marine Calcifiers: A Guide for Future Research. Report of a workshop held Vol.18.

Knutson TR, McBride JL, Chan J, Emanuel K, Holland G, Landsea C, Held I, Kossin JP, Srivastava AK, Sugi M. 2010. Tropical cyclones and climate change. Nature Geoscience **3**:157–163.

Kregel KC. 2002. Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. Journal of Applied Physiology **92**:2177–2186.

Krisko A, Radman M. 2013a. Phenotypic and Genetic Consequences of Protein Damage. PLoS Genetics, **9**(9):1003810.

Kroeker KJ, Kordas RL, Crim RN, Singh GG. 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. Ecology letters, **13**(11):34-1419.

Kroeker KJ, Kordas RL, Crim R, Hendriks IE, Ramajo L, Singh GS, Duarte CM, Gattuso JP. 2013. Impacts of

- ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology* **19**:1884–1896.
- Landry J, Bernier D, Chretien P, Marceau N, Nicole LM, Tanguay RM. 1982. Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Research*, **42**(6):61-2457.
- Landry J, Chrétien P. 1983. Relationship between hyperthermia-induced heat-shock proteins and thermotolerance in Morris hepatoma cells. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **61**(6):428-37
- Le Quéré C, Aupach MR, Canadell JG, Marland G 2009. Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature Geoscience* **2**:831–836.
- Lenkinski RE, Chen DM, Glickson JD, Goldstein G. 1977. Nuclear magnetic resonance studies of the denaturation of ubiquitin. *Biochimica et biophysica acta*, **494**(1):30-126.
- Leslie HM. 2005. A synthesis of marine conservation planning approaches. *Conservation Biology*, **19**(6):1701-1713.
- Lesser MP. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology* **68**:253–278.
- Lesser MP. 2011. Oxidative Stress in Tropical Marine Ecosystems. In: *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. Abele D, Vázquez-Medina JP, Zenteno-Savín, T (Eds). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 7-19.
- Levitus S, I. Antonov J, P. Boyer T, A. Locarnini R, Garcia H, Mishonov A. 2009. Global ocean heat content 1955–2008 in light of recently revealed instrumentation problems. *Geophysical Research Letters*, **36**.
- Li GC, Werb Z. 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**(10):3218-3222.
- Lindquist S. 1986. The Heat-Shock Response. *Annual Review of Biochemistry* **55**:1151–1191.
- Lindquist S. 1993. Autoregulation of the Heat-Shock Response, **55**:91-1151.
- Lockyear JF, Hecht T, Kaiser H, Teske PR. 2006. The distribution and abundance of the endangered Knysna seahorse *Hippocampus capensis* (Pisces: *Syngnathidae*) in South African estuaries. *African Journal of Aquatic Science*, **31**(2):275-283.
- Lopes A, Trübenbach K, Teixeira T, Lopes V, Pires V, Baptista M, Repolho T, Calado R, Diniz M, Rosa R. 2013. Oxidative stress in deep scattering layers: Heat shock response and antioxidant enzymes activities of myctophid fishes thriving in oxygen minimum zones. *Deep Sea Research Part I Oceanographic*

Research Papers, **82**:10-16.

- Lopes AR. 2018. Impact of climate change and contamination in the oxidative stress response of marine organisms. Dissertação. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Lopes AR, Borges FO, Figueiredo C, Sampaio E, Diniz M, Rosa R, Grilo TF. 2019. Transgenerational exposure to ocean acidification induces biochemical distress in a keystone amphipod species (*Gammarus locusta*). *Environmental Research*, **170**:168–177.
- Lopes AR, Sampaio E, Santos C, Couto A, Pegado MR, Diniz M, Munday PL, Rummer JL, Rosa R. 2018. Absence of cellular damage in tropical newly hatched sharks (*Chiloscyllium plagiosum*) under ocean acidification conditions. *Cell Stress and Chaperones* **23**:837–846.
- Lotze HK, Lenihan HS, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke RG, Kay MC, Kidwell SM, Kirby MX, Peterson CH, Jackson JBC. 2006. Depletion degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science*, **312**(5781):9-1806.
- Lourie SA, Foster SJ, Cooper EWT, Vincent ACJ. 2004. A Guide to the Identification of Seahorses. University of British Columbia and World Wildlife Fund.3-7
- Lourie SA, Vincent ACJ, Hall HJ, Project Seahorse. 1999. Seahorses : an identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse.2-5
- Lundquist CJ, Granek EF. 2005. Strategies for Successful Marine Conservation: Integrating Socioeconomic, Political, and Scientific Factors. *Conservation Biology*, **19**:1771-1778.
- Lushchak VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, **101**:13–30.
- Maclouf J, Grassi J, Pradelles P. 2012. Development of Enzyme-Immunoassay Techniques for Measurement of Eicosanoids. Prostaglandin and Lipid Metabolism in Radiation Injury, 355-364.
- Mai ACG, Rosa IM de L. 2009. Ecological aspects of the seahorse *Hippocampus reidi* in the Camurupim/Cardoso estuary, Piauí State, Brazil, as subsidies for the implementation of an Environmental Protection Area TT - Aspectos ecológicos do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no estuário C. *Biota Neotropica* **9**:85–91.
- Mai ACG, Velasco G. 2012. Population dynamics and reproduction of wild longsnout seahorse *Hippocampus reidi*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **92**(2):421-427.
- Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. 1995. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *Journal of Clinical Investigation*, **95**(4):1446-1456.

- Martin-Smith KM, Vincent ACJ. 2006. Exploitation and trade of Australian seahorses, pipehorses, sea dragons and pipefishes (Family *Syngnathidae*). *ORYX*, **40**(2):141-151.
- Maulvault AL, Custódio A, Anacleto P, Repolho T, Pousão P, Nunes ML, Diniz M, Rosa R, Marques A. 2016. Bioaccumulation and elimination of mercury in juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) in a warmer environment. *Environmental Research*, **149**:77-85.
- McNeil BI, Sasse TP. 2016. Future ocean hypercapnia driven by anthropogenic amplification of the natural CO₂ cycle. *Nature*, **529**(7586):6-383.
- Mcpherson JM, Vincent ACJ. 2004. Assessing East African trade in seahorse species as a basis for conservation under international controls. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **14**(5):521-538.
- Meehl GA, Stoker T, Collins W, Friedlingstein P. 2007. Global Climate Projections. 747-846
- Melzner F, Gutowska MA, Langenbuch M, Dupont S, Lucassen M, Thorndyke MC, Bleich M, Pörtner HO. 2009. Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine ectothermic animals: Pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences*, **6**:2313-2331.
- Miller CB. 2009. *Biological Oceanography*. 2nd edition, Wiley-Blackwell, **3**:57-61
- Mizzen LA, Welch WJ. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *Journal of Cell Biology*, **106**(4):16-1105.
- Montaner B, O'Donovan P, Reelfs O, Perrett CM, Zhang X, Xu YZ, Ren X, Macpherson P, Frith D, Karran P. 2007. Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein. *EMBO Reports*, **8**(11):1079-1074.
- Mora C, Ospína AF. 2001. Tolerance to high temperatures and potential impact of sea warming on reef fishes of Gorgona Island (tropical eastern Pacific). *Marine Biology*, **139**(4):765-769.
- Morgan SK, Vincent ACJ. 2007. The ontogeny of habitat associations in the tropical tiger tail seahorse *Hippocampus comes*, Cantor, 1850. *Journal of Fish Biology*, **71**:701-724.
- Morris R, Taylor EW, Brown DJA, Brown JA. 1989. Acid toxicity and aquatic animals. Society for Experimental Biology Seminar Series. Cambridge: Cambridge University Press. **75**:20-9309
- Mumby PJ, Steneck RS. 2008. Coral reef management and conservation in light of rapidly evolving ecological paradigms, *Trends in ecology & evolution*, **23**(10):63-555.
- Njemini R, Demanet C, Mets T. 2005. Comparison of two ELISAs for the determination of Hsp70 in serum. *Journal of Immunological Methods*, **306**(1-):82-176.
- NOAA. 2019. State of the Climate: Global Climate Report for Annual 2018.

- Oelkers EH, Cole DR. 2008. Carbon dioxide sequestration: A solution to a global problem. *Elements*, **4**:305–310.
- Olden JD, Hogan ZS, Zanden MJ Vander. 2007. Small fish, big fish, red fish, blue fish: Size-biased extinction risk of the world's freshwater and marine fishes. *Global Ecology and Biogeography*, **16**:694-701.
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Reimer EM, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar RG, Plattner GK, Rodgers KB, Sabine CL, Sarmiento JL, Schlitzer R, Slater RD, Totterdell IJ, Weirig MF, Yamanaka Y, Yool A. 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, **437**:681–686.
- Orth RJ, Carruthers T, Dennison W, Kendrick C, Judson Kenworthy W, Olyarnik S, Short FT, Waycott M, Williams SL. 2006. A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience*, **56**:987–996.
- Pannunzio TM, Storey KB. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **221**:277–292.
- Pastor Gutiérrez L, Cubero YP, Igor R, Wong C, Pablo P, Monteagudo C. 2011. Estudio De Las Poblaciones De Caballitos De Mar En Dos Zonas De La Costa Norte De La Habana Y Pinar Del Río. Cuba Study of Seahorse Populations in Two Areas in the North Coast of La Havana and Pinar Del Río, Cuba. *Rev. Mar. Cost* **3**:171–181.
- Peacock M, Brem R, Macpherson P, Karran P. 2014. DNA repair inhibition by UVA photoactivated fluoroquinolones and vemurafenib. *Nucleic Acids Research*, **42**(22):22-13714.
- Perissinotto R, Pakhomov EA. 1998. Contribution of salps to carbon flux of marginal ice zone of the Lazarev Sea, southern ocean. *Marine Biology*, **131**:25–32.
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD. 2005. Ecology: Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science*, **308**:1912–1915.
- Perry AL, Lunn KE, Vincent ACJ. 2010. Fisheries, large-scale trade, and conservation of seahorses in Malaysia and Thailand. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **20**(4):464-475.
- Philippart CJM, Anadón R, Danovaro R, Dippner JW, Drinkwater KF, Hawkins SJ, Oguz T, O'Sullivan G, Reid PC. 2011. Impacts of climate change on European marine ecosystems: Observations, expectations and indicators. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology*, **400**(1-2):52-69
- Pimentel M, Pegado M, Repolho T, Rosa R. 2014. Impact of ocean acidification in the metabolism and swimming behavior of the dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) early larvae. *Marine Biology*, **161**(3):725-729.

- Pimentel MS, Faleiro F, Dionisio G, Repolho T, Pousao-Ferreira P, Machado J, Rosa R. 2014. Defective skeletogenesis and oversized otoliths in fish early stages in a changing ocean. *Journal of Experimental Biology*, **217**:2062-2070.
- Pimentel MS, Faleiro F, Diniz M, Machado J, Pousão-Ferreira P, Peck MA, Pörtner HO, Rosa R. 2015. Oxidative stress and digestive enzyme activity of flatfish larvae in a changing ocean. *PLoS ONE* **10**:1–18.
- Pimentel M. 2016. Effects of ocean warming and acidification on the early stages of marine fishes. *Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa*, pp158-160.
- Polidoro BA, Carpenter KE, Collins L, Duk NC, Ellison AM, Ellison JC, Farnsworth EJ, Fernando ES, Kathiresan K, Koedam NE, Livingstone SR, Miyagi T, Moore GE, Nam VN, Ong JE, Primavera JH, Salmo III SG, Sanciangco JC, Sukardlo S, Wang Y, Young JWH. 2010. The loss of species: Mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. *PLoS ONE*, **5**(4):10095.
- Polo SE, Jackson SP. 2011. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: A focus on protein modifications. *Genes & Development*, **25**(5):33-409.
- Polovina J, Howell E, Abécassis M. 2008. Ocean's least productivity waters expanding. *Geophysical Research Letters*, **35**(3):L03618.
- Pörtner HO, Langenbuch M, Reipschläger A. 2004. Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography*, **60**:705-718.
- Pörtner HO, Mark FC, Bock C. 2004. Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, **141**(3):60-243.
- Portner HO, Langenbuch M, Michaelidis B. 2005. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. *Journal of Geophysical Research Oceans*, **110**(9).
- Portner HO, Knust R. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, **315**(5808):7-95.
- Rahmstorf S, Cazenave A, Church J a, Hansen JE, Keeling RF, Parker DE, Somerville RCJ. 2007. Recent climate observations compared to projections. *Science*, **316**(5825):709.
- Raven J, Caldeira K, Elderfield H, Hoegh-Guldberg O, Liss P, Riebesell U, Shepherd J, Turley C, Watson A. 2005. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. *Royal Society Policy Document*, 19-23

- Rechsteiner M. 2002. Ubiquitin-Mediated Pathways For Intracellular Proteolysis. *Annual Review of Cell Biology*, **3**(1987):1-30.
- Repetto M, Semprine J, Boveris A. 2012. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In: *Lipid peroxidation*, Catala A (eds). Rijeka, Croatia: InTech, volume I.
- Roessig JM, Woodley CM, Cech JJ, Hansen LJ. 2004. Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **14**(2):251-275.
- Rosa IL, Dias TL, Baum JK. 2002. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933 (*Syngnathidae*). *Environmental Biology of Fishes*, **64**:378.
- Rosa IL, Oliveira TPR, Castro, ALC, Moraes LES, Xavier JHA, Nottingham MC, Dias TLP, Bruto-Costa LV, Araújo ME, Birolo AB, Mai ACG, Monteiro-Neto C. 2007. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: *Syngnathidae*). *Neotropical Ichthyology*, **5**:405–414
- Rosa R, Seibel BA. 2008. Synergistic effects of climate-related variables suggest future physiological impairment in a top oceanic predator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(52)20776-20780.
- Rosa R, Seibel BA. 2010. Metabolic physiology of the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*: Implications for vertical migration in a pronounced oxygen minimum zone. *Progress in Oceanography*, **86**(1):72-80.
- Rosa R, Pimentel MS, Boavida-Portugal J, Teixeira T, Trübenbach K, Diniz M. 2012. Ocean warming enhances malformations, premature hatching, metabolic suppression and oxidative stress in the early life stages of a keystone squid. *PLoS ONE*, **7**(6):e38282.
- Rosa R, Trubenbach K, Pimentel MS, Boavida-Portugal J, Faleiro F, Baptista M, Dionisio G, Calado R, Portner HO, Repolho T. 2014. Differential impacts of ocean acidification and warming on winter and summer progeny of a coastal squid (*Loligo vulgaris*). *Journal of Experimental Biology*, **217**:518–525.
- Rosa R, Baptista M, Lopes VM, Pegado MR, Paula JR, Trübenbach K, Leal MC, Calado R, Repolho T. 2014. Early-life exposure to climate change impairs tropical shark survival. *Proceedings Biological Sciences*, **281**(1793):0-6.
- Rosa R, Paula JR, Sampaio E, Pimentel M, Lopes AR, Baptista M, Guerreiro M, Santos C, Campos D, Almeida-Val VMF, Calado R, Diniz M, Repolho, T. 2016. Neuro-oxidative damage and aerobic potential loss of sharks under elevated CO₂ and warming. *Marine Biology*, **163**(5):119.
- Rowley RJ. 1994. Marine reserves in fisheries management. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **4**(3): 233-254.
- Ryan J, Hightower LE. 1996. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. Page

Stress-inducible Cellular Responses, **77**:411-424.

- Sachdeva M, Karan M, Singh T, Dhingra S. 2014. Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review. *Spatula DD - Peer Reviewed Journal on Complementary Medicine and Drug Discovery*, 4: 1-16.
- Salin KR, Yohannan TM, Mohanakumaran Nair C. 2005. Fisheries and trade of seahorses, *Hippocampus* spp., in southern India. *Fisheries Management and Ecology*, **12**(4): 269-273.
- Samoilys MA, Martin-Smith KM, Giles BG, Cabrera B, Anticamara JA, Brunio EO, Vincent ACJ. 2007. Effectiveness of five small Philippines' coral reef reserves for fish populations depends on site-specific factors, particularly enforcement history. *Biological Conservation*, **136**(4):584-601.
- Sampaio E, Lopes AR, Francisco S, Paula, JR, Pimentel M, Maulvault AL, Repolho T, Grilo TF, Pousão-Ferreira P, Marques A, Rosa R. 2018. Ocean acidification dampens physiological stress response to warming and contamination in a commercially-important fish (*Argyrosomus regius*). *Science of the Total Environment*, **15**(618):388-398.
- Sampaio E, Rosa R. 2019. Climate Change, Multiple Stressors, and Responses of Marine Biota. In: *Encyclopedia of the UN Sustainable Development Goals - Climate Action*, Filho WL (Eds). Springer Nature, Basingstoke, 1-13.
- Sayer M, P. Reader J, R. K. Dalziel T. 1993. Freshwater acidification: Effects on the early life stages of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **3**:95-132.
- Schlesinger MJ. 1990. Heat shock proteins. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology. The Journal of biological chemistry*, **265**:12111-4.
- Sciandra JJ, Subjeck JR. 1983. The effects of glucose on protein synthesis and thermosensitivity in Chinese hamster ovary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **258**(20):3-12091.
- Shen J, Deininger P, Hunt JD, Zhao H. 2007. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer*, **109**(3):80-574.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *European journal of biochemistry*, **215**:213-9.
- Sies H, Cadenas E. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **311**(1152):31-617.
- Silva CSE, Novais SC, Lemos MFL, Mendes S, Oliveira AP, Gonçalves EJ, Faria AM. 2016. Effects of ocean acidification on the swimming ability, development and biochemical responses of sand smelt larvae. *The Science of the Total Environment*, **563-564**:89-98.
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins.

Ecology Letters, **6**(1):1025–1037.

Steneck RS, Graham MH, Bourque BJ, Corbett D, Erlandson JM, Estes JA, Tegner MJ. 2002. Kelp forest ecosystems: Biodiversity, stability, resilience and future. *Environmental Conservation*, **29**(4):436-459 .

Stiasny MH, Mittermayer FH, Sswat M, Voss R, Jutfelt F, Chierici M, Puvanendran V, Mortensen A, Reusch TBH, Clemmesen C. 2016. Ocean acidification effects on Atlantic cod larval survival and recruitment to the fished population. *PLoS ONE*, **11**(8):e0155448.

Teixeira T, Diniz M, Calado R, Rosa R. 2013. Coral physiological adaptations to air exposure: Heat shock and oxidative stress responses in *Veretillum cynomorium*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **439**:35–41.

Tomanek L. 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *Journal of Experimental Biology*, **213**:971–979.

Tomanek L, Zuzow MJ, Ivanina A V., Beniash E, Sokolova IM. 2011. Proteomic response to elevated PCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, **214**:1836–1844.

Trenberth KE, Josey SA. 2007. Observations: surface and atmospheric climate change. In, Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M. and Miller, H.L. (eds.) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK. Cambridge University Press, pp. 235-336..

Uchiyama M, Mihara M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, **86**(1):8-271.

Ursi S, Pedersén M, Plastino E, Snoeijs P. 2003. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (*Gracilariales*: Rhodophyta). *Marine Biology*, **142**(5):997-1007.

Valiella I, Bowen J, York JK. 2006. Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments. *BioScience*, **51**(10):807-815.

Vinagre C, Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Diniz M. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, **23**:274–279.

Vincent ACJ. 1990. Reproductive ecology of seahorses (Doctoral thesis). University of Cambridge. . <https://doi.org/10.17863/CAM.31037>

Vincent ACJ. 1996. The International Trade in Seahorses:Species in danger, traffic International,

Cambridge,170.

- Vincent ACJ, Pajaro MG, Anonymous. 1997. Community-based management for a sustainable seahorse fishery. Page 2 World Fisheries Congress Brisbane Australia, **78**: 1681–1724
- Vincent ACJ. 2011. Saving the shallows: Focusing marine conservation where people might care. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **21**:495–499.
- Vincent ACJ, Foster SJ, Koldewey HJ. 2011. Conservation and management of seahorses and other *Syngnathidae*. *Journal of Fish Biology*, **78**:1681–1724.
- Wang T, Overgaard J. 2007. The heartbreak of adapting to global warming. *Science*, **315**:49–50.
- Waycott M, Duarte CM, Carruthers TJB, Orth RJ, Dennison WC, Olyarnik S, Calladine A, Fourqurean JW, Heck KL, Hughes R, Kendrick GA, Kenworthy J, Short FT, Williams SL. 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(30):12377-12381.
- Weitzel G, Pilatus U, Rensing L. 1985. Similar dose response of heat shock protein synthesis and intracellular pH change in yeast. *Experimental Cell Research*, **159**(1):252-256.
- Wilkinson C. 2008. Status of Coral Reefs of the World: 2008. Global Coral Reef Monitoring network and Reef and Rainforest. Research Centre, Townsville, Australia, 296.
- Wilkinson KD. 1995. Roles of Ubiquitinylation in Proteolysis and Cellular Regulation. *Annual Review of Nutrition*, **15**:89-161.
- Wiseman H, Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal*, **313**(1):17-29.
- Wittmann AC, Pörtner H. 2013. Sensitivities of extant animal taxa to ocean acidification. *Nature Climate Change*, **3**:995–1001.
- Wood HL, Spicer JI, Widdicombe S, Wood HL, Spicer JI, Widdicombe S. 2009. Ocean acidification may increase calcification rates , but at a cost. *Proceedings. Biological sciences*, **275**(1644):73-1767.
- Yasue M, Kaufman L, Vincent ACJ. 2010. Assessing ecological changes in and around marine reserves using community perceptions and biological surveys. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems*, **20**(4):407-418.
- Yngve S, Aasland AL, Magnar B, Lars E, Saugstad OD. 2009. Accumulation of 8-oxoguanine in liver DNA during hyperoxic resuscitation of newborn mice. *Pediatric Research*, **66**:533-538.
- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, **74**(1):62-139.

8. Anexos

Tabela II: vários tipos de stress oxidativo.

Stress	Referências
Altas temperaturas	(Tissières <i>et al.</i> 1974; Jenkins <i>et al.</i> 1997; Otsuka <i>et al.</i> 1997; Li <i>et al.</i> 1999; Sonna <i>et al.</i> 2002)
Baixas temperaturas	(Jenkins <i>et al.</i> 1997; Goto <i>et al.</i> 1998; Li <i>et al.</i> 1999; Martinez <i>et al.</i> 2001; Sonna <i>et al.</i> 2002; Sejerkilde <i>et al.</i> 2003)
Radiação ultravioleta e metais pesados	(Trautinger <i>et al.</i> 1996; Jenkins <i>et al.</i> 1997; Kiriya <i>et al.</i> 2001)
Pesticidas	(Steinert & Pickwell 1993; Köhler & Eckwert 1997; Werner & Nagel 1997; Tedengren <i>et al.</i> 1999)
Hipoxia	(Werner & Nagel 1997; Ait-Aissa <i>et al.</i> 2000; Yang <i>et al.</i> 2002; Nazir <i>et al.</i> 2003)
Salinidade	(Ma & Haddad 1997)
Densidade alta	(Diamant <i>et al.</i> 2001; Drew <i>et al.</i> 2001; Hamilton <i>et al.</i> 2001; Spees <i>et al.</i> 2002)
Infeção viral e bacteriana	(Sørensen & Loeschcke 2001)
Parasitas	(Merino <i>et al.</i> 1998; Rinehart <i>et al.</i> 2002)
Atividade física	(Skidmore <i>et al.</i> 1995; Fehrenbach & Niess 1999)
Dessecação	(Alamillo <i>et al.</i> 1995; Tammariello <i>et al.</i> 1999)
Stress oxidativo	(Ropp <i>et al.</i> 1983; Gophna & Ron 2003)
Genética	
-Senescência	(Wheeler <i>et al.</i> 1999)
-Endogamia	(Kristensen <i>et al.</i> 2002)

-Mutações deletérias	(Sherman & Goldberg 2001; Trotter <i>et al.</i> 2002; Zhao <i>stress</i> 2002)
-----------------------------	--

Tabela III: Resultados estatísticos obtidos pelo Rstudio. Dados obtidos para o estudo às respostas fisiológicas dos juvenis *Hippocampus reidi*, os biomarcadores: HSP e ubiquitinas, e o produtos do stress oxidativo, MDA e danos de ADN.

	N (replicas)	pH	Temperatura	Média	Desvio padrão	Significância *p <0,05
HSP	6	7,5	26	0.2578124	0.04662846	0.16794
	5	7,5	29	0.9950941	0.39403523	0.00251*
	6	8	26	0.3381775	0.12018043	5.08e-07
	5	8	29	0.3587624	0.11984407	0.76502
Ubiquitinas	5	7,5	26	0.05384392	0.013822785	0.002716*
	4	7,5	29	0.16877889	0.032359765	0.011052*
	5	8	26	0.01059155	0.008780983	0.000386
	5	8	29	0.05233994	0.018597561	0.002883*
MDA	5	7,5	26	0.011944278	0.004082101	0.00137*
	4	7,5	29	0.012004185	0.004305316	0.10862
	5	8	26	0.005737625	0.001062032	4.96e-07
	5	8	29	0.008105323	0.001160718	0.06465
ADN	6	7,5	26	0.1677881	0.02162338	0.6561
	5	7,5	29	0.2271163	0.07371169	0.0369*
	6	8	26	0.1783292	0.04031595	4.09e-09
	5	8	29	0.1512650	0.03518835	0.2644