

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Ciências
ULisboa

Impactos da desoxigenação oceânica e hipóxia na fisiologia e
comportamento do choco (*Sepia officinalis*)

Marta Alexandra Apolinário Macau

Mestrado em Ciências do Mar

Dissertação orientada por:
Doutor José Ricardo Paula
Prof. Doutor Rui Rosa

Agradecimento

Quero agradecer principalmente aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, opções e loucuras, que mesmo não concordando a 100% com elas, ou com algumas dúvidas sempre fizeram tudo o que podiam para me ajudar e dar o melhor. Ao meu avô, que sempre teve a paciência incansável de ouvir as minhas histórias e me educou e acompanhou desde sempre. Ao meu Miguel, que me atura como ninguém e me apoia nas escolhas que faço, concordando ou não, que leva com o meu mau feitio e que mesmo assim continua ao meu lado. À minha Nana, que tem um feitio que choca a 100% comigo, mas que mesmo assim diz-me o que eu tenho de ouvir, que me traz à terra quando começo a divagar, mas que apesar de ser a pessoa mais irritante que tenho na minha vida, irmã sendo irmã, é aquela que mais protejo e que mais amo.

Queria agradecer aos meus orientadores pela oportunidade que me deram por poder ter esta experiência incrível na Guia, por poder pôr “as mãos na massa”. Quero agradecer ao Zé, por todo o rigor que exigiu de mim, pela obsessão com organização, mas que me fez crescer muito, tanto a nível profissional, como a nível pessoal. À minha Mel, que sem ela não sei o que tinha sido de mim, aquela que entrava comigo na guia às 7h da manhã, e que saía de lá comigo à 20h, que me ajudou em tudo o que podia, que me apoiou quando mais precisei, não tenho palavras para ela, uma pessoa que me era desconhecida passou a minha confidente, ouvinte e principalmente amiga, a quem eu ligo quando preciso de desabafar, ou para lhe contar as minhas conquistas. Quero agradecer também a todas as pessoas da Guia, que me deram dicas, ideias e que me ajudaram muito durante o tempo que lá estive.

Resumo

Os fenômenos ligados às alterações climáticas têm aumentado de forma preocupante ao longo das últimas décadas. Neste contexto, e relacionado com o aumento da temperatura do oceano, o nível médio de oxigênio dissolvido tem vindo a diminuir, tanto em oceano aberto como nas águas costeiras, desencadeando efeitos deletérios nos ecossistemas marinhos. No entanto, existe uma grande lacuna no conhecimento destes impactos em diferentes níveis de organização biológica. Neste contexto, o objetivo desta dissertação foi avaliar as respostas comportamentais (e.g., aprendizagem associativa e social; camuflagem) e fisiológicas (stress oxidativo) dos estádios iniciais de vida de choco (*Sepia officinalis*) a concentrações reduzidas de oxigênio. A diminuição de oxigênio foi modelada de forma crónica ($7 \text{ mgL}^{-1} \text{ O}_2$ – desoxigenação) e de forma aguda apenas durante a noite ($4 \text{ mgL}^{-1} \text{ O}_2$ – hipóxia leve) e $2 \text{ mgL}^{-1} \text{ O}_2$ – hipóxia severa).

Os indivíduos expostos a hipóxia severa revelaram tamanhos menores (~20%), uma menor taxa de eclosão (~10%) e um aumento significativo no tempo de embriogénese (~30%), evidenciando a possibilidade de existência de depressão metabólica devido ao metabolismo aeróbico ser limitado pelo deficiente fornecimento de oxigênio.

Ao nível do dano oxidativo, observou-se um aumento significativo de lípido peroxidase (LPO), sugerindo uma incapacidade na prevenção de criação de radicais livres de oxigênio durante o processo de reoxigenação, favorecendo a ocorrência de danos ao nível dos sistemas de defesa antioxidantes. Estes danos nas defesas antioxidantes revelaram-se, com a diminuição da atividade de teor total antioxidante (TAC), glutatona S-transferase (GST) e superoxidase dismutase (SOD). Em relação à aprendizagem, observou-se um decréscimo significativo no número de ataques realizados nos indivíduos expostos a hipóxia severa, assim como um aumento no tempo de latência dos mesmos, visto a visão ser um dos processos sensoriais mais exigentes a nível metabólico. Estes resultados sugerem que tenha ocorrido uma limitação grave a nível ocular dificultando a perceção da existência da presa no local, limitando a sua sensibilidade aos movimentos da mesma. A diminuição de oxigênio pode também ter afetado a produção de inibidores neurotransmissores, diminuindo a atividade cerebral, traduzindo-se numa dificuldade na alimentação por parte destes indivíduos. Na camuflagem, observou-se um aumento no tempo de latência relativamente ao substrato complexo em indivíduos expostos a O_2 limitado, podendo revelar novamente uma deficiente capacidade visual devido à limitação de oxigênio durante o período de embriogénese.

Estes resultados demonstram que a diminuição de O_2 , provoca uma limitação comportamental e fisiológica, assim como uma alteração a nível visual que impossibilita os comportamentos esperados para os testes de aprendizagem e de camuflagem.

Palavras-chave: cefalópodes, limitação O_2 , aprendizagem social, camuflagem, biomarcadores

Abstract

Climate change-related events have been greatly increasing in the last decades. Alongside, due to global warming, dissolved oxygen levels have been declining in both open coastal regions, eliciting deleterious effects on the marine ecosystems. Yet, there is lack of knowledge regarding such impacts in many marine taxonomic groups and the respective responses at different levels of biological organization. Within this context, the aim of this dissertation was to evaluate the behavioural (learning and camouflage) and physiological (oxidative stress) responses of European cuttlefish (*Sepia officinalis*) early life stages to low oxygen conditions, including chronic ($7 \text{ mgL}^{-1} \text{ O}_2$ – deoxygenation) and high time acute exposures ($4 \text{ mgL}^{-1} \text{ O}_2$ – mild hypoxia; $2 \text{ mgL}^{-1} \text{ O}_2$ – severe hypoxia). Severe hypoxia induced significantly lower hatching rates (~10% decrease), increased development time (~30% increase), and smaller size at hatch (~20% decrease). These results may suggest metabolic depression due to deficient oxygen supply. In terms of oxidative damage, a significant increase in lipid peroxidation (LPO) was observed, suggesting an inability to prevent the creation of ROS during the reoxygenation process, favouring the occurrence of damage to the antioxidant defence systems. These damages in the antioxidant defences were revealed, with the decrease of the activity of total antioxidant capacity (TAC), glutathione transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD).

At behavioural level, a lower number of attacks performed by individuals exposed to severe hypoxia was observed, as well as an increase in the latency time. Since the vision is one of the most demand sensory processes at the metabolic level, the results suggest some visual impairment to perceive the existence of the prey. The decrease in oxygen may also have affected the production of neurotransmitter inhibitors, decreasing brain activity.

An increase in latency time relative to the complex substrate was observed in subjects exposed to limited O_2 , which may reflect again deficient visual ability due to oxygen limitation during the period of embryogenesis. This difficulty in camouflage may facilitate their capture by their predators. In overall, these present results demonstrate that the decrease in O_2 levels causes significant behavioural and physiological changes, which may comprise cuttlefish fitness in the ocean of tomorrow.

Keywords: cephalopods, O_2 limitation, Social Learning, camouflage, biomarkers

ÍNDICE

Agradecimento.....	II
Resumo	III
Abstract.....	IV
Lista de Figuras.....	VII
Lista de Tabelas	X
Lista de Abreviaturas	XI
Símbolos Químicos.....	XI
1 Introdução.....	12
1.1 Revolução industrial e alterações climáticas	12
1.2 Diminuição do oxigénio no oceano	15
1.3 Repostas biológicas às alterações climáticas: fisiologia e comportamento	18
1.4 Biologia geral e ecologia da espécie <i>Sepia officinalis</i>.....	20
1.4.1 Cognição em cefalópodes	21
1.4.2 Camuflagem	22
1.4.3 Impactos das alterações climáticas na espécie <i>S. officinalis</i>	23
1.5 Objetivos	23
2 Material e métodos	25
2.1 Captura e aclimação de ovos de choco.....	25
2.2 Experiência de aprendizagem.....	27
2.3 Experiência de Camuflagem	29
2.4 Análise de Biomarcadores	31
2.4.1 Preparação de extratos dos tecidos	31
2.4.2 Teor de proteína total.....	31
2.4.3 Atividade de Catalase (CAT).....	31
2.4.4 Glutathione S-transferase (GST)	31
2.4.5 Teor de Malondialdeído (LPO)	32
2.4.6 Teor total antioxidante (TAC).....	32
2.4.7 Glutathione peroxidase (GPx).....	32
2.4.8 Superoxidase dismutase (SOD)	33
2.4.9 Proteína choque de calor 70 (HSP70)	33
2.4.10 Teor de OHdG (Dano de DNA).....	34
2.5 Análise Estatística	34
2.5.1 Análise de sobrevivência	34
2.5.2 Modelos lineares generalizados mistos	35
3 Resultados.....	36
3.1 Sucesso de eclosão e tamanho do manto	36
3.2 Testes de aprendizagem.....	37
3.3 Análise da camuflagem.....	39
3.4 Análise de biomarcadores	42
4 Discussão	44
4.1 Desenvolvimento embrionário	45
4.2 Respostas fisiológicas.....	45
4.3 Comportamento	46
4.3.1 Aprendizagem.....	46

4.3.2 Camuflagem	46
5 Considerações finais.....	47
6 Bibliografia.....	48

Lista de Figuras

Figura 1.1: Curva de Keeling – Concentração de CO ₂ medido mensalmente no Laboratório de Mauna Loa, Havai desde 1960 até 2020.	12
Figura 1.2: Representação das previsões de alteração da temperatura média global em função de cinco diferentes cenários SSP futuros, desde o ano de 1950 até 2100 (IPCC; 2021).....	13
Figura 1.3: Esquema geral do ciclo de carbono, onde se pode observar as diferentes perturbações antropogénicas (acumulação terrestre, acumulação de águas interiores, recursos antropogénicos e acumulação oceânica) que contribuem para o aumento de CO ₂ na atmosfera (Battin et al., 2009a). ...	14
Figura 1.4: Projeção de alteração na concentração atmosférica de CO ₂ desde 2015 até 2100 em função dos diferentes cenários SSP. Fonte: IPCC (2021).	14
Figura 1.5: Representação dos cenários futuros segundo o IPCC, 2021 para a alteração do oxigénio dissolvido.	15
Figura 1.6: Representação de locais de zonas de reduzida concentração de oxigénio (principalmente na zona costeiro do oceano Pacífico e zona costeira do oceano Índico) e zonas de hipóxia (distribuído junto à zona costeira dos continentes) ao longo de todo o globo (Breitburg et al., 2018).....	16
Figura 1.7: Respostas metabólicas às alterações de O ₂ no ambiente. A tensão crítica de oxigénio (P _{crit}) de uma espécie é o ponto em que a taxa de consumo de O ₂ passa a ser independente dos níveis ambientais de O ₂ (frequentemente referidos como em conformidade com O ₂) para ser aumentado, afetando negativamente a tolerância à hipoxia através do aumento de processos energeticamente caros como a reprodução, crescimento ou digestão. O P _{crit} também pode ser diminuído, aumentando a tolerância à hipoxia através de alterações na respiração, transporte/entrega de O ₂ , ou através de reduções em processos energeticamente caros como a reprodução, digestão e natação. Adaptado de Richards, 2009.....	16
Figura 1.8: Ciclo de carbono, onde se observa a interferência antropogénica (CO ₂) e a sua implicação na calcificação dos indivíduos. Fonte: (Battin et al., 2009a).	18
Figura 1.9: Tolerância à limitação de oxigénio das diferentes classes de complexidade do olho. Onde se observa que o filo molusca se apresenta como classe IV (mais complexa) mas também a que menor tolerância apresenta à diminuição do oxigénio. Figura adaptada de (McCormick & Levin, 2017).	19
Figura 1.10: Distribuição geográfica de <i>Sepia officinalis</i> , maioritariamente na zona do norte da Europa. Fonte: FAO.	20
Figura 1.11: Esquema de ataque de <i>S. officinalis</i> . Primeiro o indivíduo encontra-se em repouso, depois deteta a presença da presa e move-se na sua direção, onde finalmente lança os seus dois braços extensíveis para capturar a presa. Fonte: (Wells, 1958).	21
Figura 1.12: Representação das diferentes categorias de camuflagem em <i>S. officinalis</i> : a) uniforme; b) mottle; c) disruptivo. Fonte: (Barbosa et al., 2008)	23
Figura 2.1: Sistemas aquáticos utilizados durante a experiência. São visíveis tanques replicados, colunas de desoxigenação, controladores e reservatórios de filtração biológica.	26
Figura 2.2: Esquema da circulação e incorporação de N ₂ no sistema aquático e controlo de oxigénio.	26
Figura 2.3: Arenas utilizadas para testes de aprendizagem associativa e aprendizagem social. A filmagem destes testes foi realizada pelo topo.	28
Figura 2.4: Arenas de areia (a) e da mistura de pedras (b) utilizadas durante a experiência de camuflagem.	29
Figura 2.5: Captura remota de imagens para determinar características qualitativas e quantitativas da camuflagem dos chocós.	29

Figura 2.6: Representação da análise de intensidade de camuflagem: a) plano frontal; b) plano transversal; c) região clara do indivíduo comparado com as pedras brancas; d) região escura do indivíduo comparada com as pedras escuras	30
Figura 3.1: Proporção de eclosão de <i>S. officinalis</i> em função do número de dias nos diferentes tratamentos, controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa. As linhas representam a proporção de eclosão dos chocos, as áreas a sombreado representam intervalos de confiança de 95%.	36
Figura 3.2: Tamanho do manto de chocos recém eclodidos expostos a diferentes tratamentos de redução de oxigénio. Os pontos cinzentos representam os valores obtidos, os pontos pretos a médias previstas transformadas do modelo, as barras representam intervalos de confiança (95%) do modelo.	37
Figura 3.3: Probabilidade de ataque à presa no tubo em função do número de tentativas no teste de aprendizagem associativa em chocos expostos aos diferentes tratamentos, controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa.	37
Figura 3.4: Probabilidade de ataque à presa no tubo em função do número de tentativas no teste de aprendizagem social. A) de chocos que observam demonstradores provenientes do mesmo tratamento dos observadores e de chocos que observaram demonstradores provenientes do controlo. B) em chocos expostos aos diferentes tratamentos, controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa, independentemente da proveniência do demonstrador. As linhas representam a probabilidade de ataque, as áreas a sombreado representam intervalos de confiança a 95%	38
Figura 3.5: Número de ataques em função de tentativa em cada um dos tratamentos em demonstradores (a) e observadores (b). As linhas representam a média prevista do modelo, o sombreado o intervalo de confiança a 95% e os pontos os valores medidos. A vermelho está representado o controlo, a azul a desoxigenação, a verde a hipóxia leve, a roxo a hipóxia severa.	38
Figura 3.6: Tempo de latência ao primeiro ataque em função do tratamento (controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa) e da função do choco (demonstrador a vermelho e observador a azul). Os pontos carregados as médias previstas transformadas do modelo, e as barras representam intervalos de confiança (95%) do modelo.....	39
Figura 3.7: Tempo de latência verificado nos indivíduos dos tratamentos correspondentes, controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa, onde se representa o intervalo de confiança de 95% e os pontos representam os valores de cada indivíduo em segundos.....	39
Figura 3.8: Representação da análise de tentativa de enterro, onde se representam os tratamentos analisados (controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa) demonstrando o intervalo de confiança de 95% para cada um, e os pontos a resposta de cada indivíduo.	40
Figura 3.9: Representação das pontuações no ambiente de areia (a) e no ambiente de pedras, com a representação do intervalo de confiança de 95% e onde os pontos representam a resposta individual de cada indivíduo.	40
Figura 3.10: Representação da análise de diferença de pixéis entre os tratamentos analisados (controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa), representação do intervalo de confiança de 95% e os pontos representam a diferença verificada no manto de cada indivíduo individualmente para o padrão disruptivo.....	41
Figura 3.11: A análise de diferença de densidade de pixéis integrados não demonstrou diferenças significativas, tanto na comparação do quadrado branco com as pedras brancas (a), como região escura do indivíduo com pedras pretas (b).	41
Figura 3.12: Resultados da análise dos biomarcadores analisados nesta dissertação. (a) representa o teor total de antioxidante, (b) teor de Malondialdeído, (c) proteína de choque de calor 70, (d) teor de catalase, (e) concentração de glutathiona peroxidase, (f) concentração de glutathiona S- transferase, (g) percentagem de superoxidase dismutase e (h) dano de DNA dos tecidos. Representa-se em todos os	

gráficos o intervalo de confiança de 95% e os pontos representam a resposta individual de cada organismo relativamente a cada um dos biomarcadores. 43

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Parâmetros abióticos registados ao longo da experiência.	27
Tabela 4.1: Tabela resumo dos efeitos observados em função da redução de oxigénio em choco. São apresentadas as diferentes variáveis e respostas em função dos três tipos de exposição. NS = sem alterações significativas, ↑ = aumento significativo, ↓ = diminuição significativa.	44

Lista de Abreviaturas

IPCC	Painel Intergovernamental de Alterações Climáticas
GEE	Gases de efeito estufa
pH	pH
ATP	Adenosina trifosfato
TAC	capacidade oxidativa total
PFK-1	6-fosfofructo-1-kinase
HIF	ativação do fator de transcrição
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigénio
PVF	fluido peri-vitelino
BSA	sérica albumina bovina
CAT	Catalase
GST	Glutathione S-transferase
LPO	Lípido peroxidase
TAC	Teor total antioxidante
GPx	Glutathione peroxidase
SSPx	Shared Socioeconomic Pathways
TCO	Teor de calor oceânico
OMZ	Zonas mortas
Pcrit	Pressão parcial de oxigénio crítica
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
LMG	Laboratório Marítimo da Guia
UV	Ultravioleta
W	Watt
SOD	Superoxidase dismutase
HSP70	Proteína choque de calor 70
MQW	água milli-Q
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

Símbolos Químicos

CO ₂	Dióxido de carbono
O ₂	Oxigénio
H ₂ S	Sulfito de hidrogénio
N ₂	Azoto
NO ₃ ⁻	Nitrato
MnO ₄	Permanganato
FeOH	Hidróxido de ferro
SO ₄ ²⁻	Sulfato
Mn ²⁺	Manganês
Fe ²⁺	Ferro
H ₂ S	Hidrogeno sulfeto
CH ₄	Metano

1 Introdução

1.1 Revolução industrial e alterações climáticas

As alterações climáticas são definidas como mudanças no clima, em particular resultante de alterações na composição da atmosfera como nomeadamente o aumento da concentração de dióxido de carbono (IPCC, 2021). Este aumento revelou-se abrupto durante a revolução industrial, a qual ocorreu na segunda metade do século XVIII, devido à intensificação da atividade humana, utilização de combustíveis fósseis, alterações no uso de terras na agricultura e industrialização (Bogan et al., 2008). O aumento da concentração de CO₂ até agora tem provocado alterações ao nível da atmosfera, levando ao aumento do efeito de estufa (processo físico que ocorre quando parte da radiação infravermelha emitida pela superfície da terra é absorvida por determinados gases, levando a um aumento de temperatura) e consequentemente o aquecimento global (Bogan et al., 2008).

Os gases de efeito de estufa (GEEs – dióxido de carbono, metano, óxido nítrico, hidrofluorcarbono, perfluorcarbono) podem ser separados em duas categorias: os que ocorrem naturalmente (por formação de vapor de água, dióxido de carbono ou outros gases) e os provenientes de atividade humana (como combustíveis fósseis e indústria). Os que ocorrem naturalmente captam algumas das radiações provenientes do calor da superfície da Terra, tendo um papel benéfico, pois mantêm a temperatura da superfície da Terra estável. Em contrapartida, os gases provenientes da atividade humana provocam um aumento desmedido na temperatura global do planeta (Bogan et al., 2008; Vitousek, 1992). O aumento de CO₂ na atmosfera tem-se intensificado ao longo dos anos (**Figura 1.1**), o que foi observado por Charles Keeling, e terá concluído que: i) ocorriam alterações sazonais na concentração de CO₂ devido ao crescimento das plantas no hemisfério norte e ii) o CO₂ na atmosfera aumentava de ano para ano (Staddon et al., 2020), levando a previsões preocupantes de se atingirem emissões de 130watt/m², aproximadamente, no pior dos cenários (SSP5-8.5).

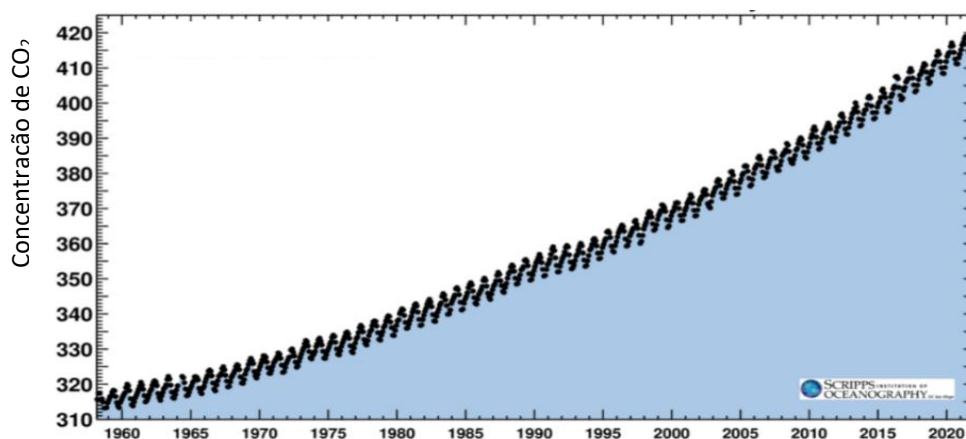


Figura 1.1: Curva de Keeling – Concentração de CO₂ medido mensalmente no Laboratório de Mauna Loa, Havaí desde 1960 até 2020.

O Painel Intergovernamental de Alterações Climáticas (IPCC) é uma organização internacional que avalia as alterações climáticas e os seus impactos e elabora projeções para cenários futuros (Bogan et al., 2008), IPCC,2021. Um dos modelos mais conhecidos, os Shared Socioeconomic Pathways (SSPx-y) referem-se ao caminho socioeconómico compartilhado, descrevendo a tendência de diferentes cenários, a componente “y” refere-se à força radioativa para os diferentes níveis (watt/m² ou W m⁻²) da emissão de GEE. Os SSPx são previstos em cinco cenários: muito baixa ou baixa emissão de GEE

(SSP1-1.9, SSP1-2.6), emissão intermédia de GEE (SSP2-4.5), alta e muito alta emissão de GEE (SSP3-7.0 e SSP5-8.5). No pior dos cenários, por exemplo, o aumento da temperatura da superfície global irá aumentar em aproximadamente 4°C até ao ano de 2100 (**Fig. 1.2**).

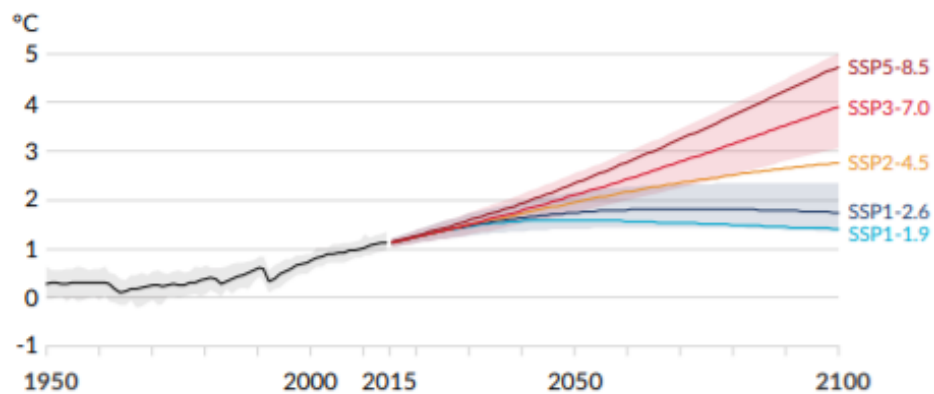


Figura 1.2: Representação das previsões de alteração da temperatura média global em função de cinco diferentes cenários SSP futuros, desde o ano de 1950 até 2100 (IPCC; 2021).

Ao longo dos anos os ecossistemas marinhos, nomeadamente os oceanos, têm-se revelado essenciais na absorção/armazenamento de cerca de 30% das emissões do CO₂ antropogénico, atrasando os seus efeitos catastróficos na atmosfera (Khaliwala et al., 2013). Estes ambientes são essenciais para o ciclo de carbono, que se baseia na soma do ciclo de carbono natural mais a perturbação antropogénica, observável na **Figura 1.3** (Bernardello et al., 2014). Este armazenamento provém da alta solubilidade do CO₂ nas águas e pela sua migração vertical da superfície até ao fundo do oceano, adquirindo o nome de bomba biológica, permitindo a regulação dos valores de pCO₂ atmosféricos (Bernardello et al., 2014). Este fenómeno está relacionado com a interação existente entre a atmosfera e o oceano, ocorrendo trocas gasosas, fotossíntese, remineralização, mistura e transporte (Bernardello et al., 2014).

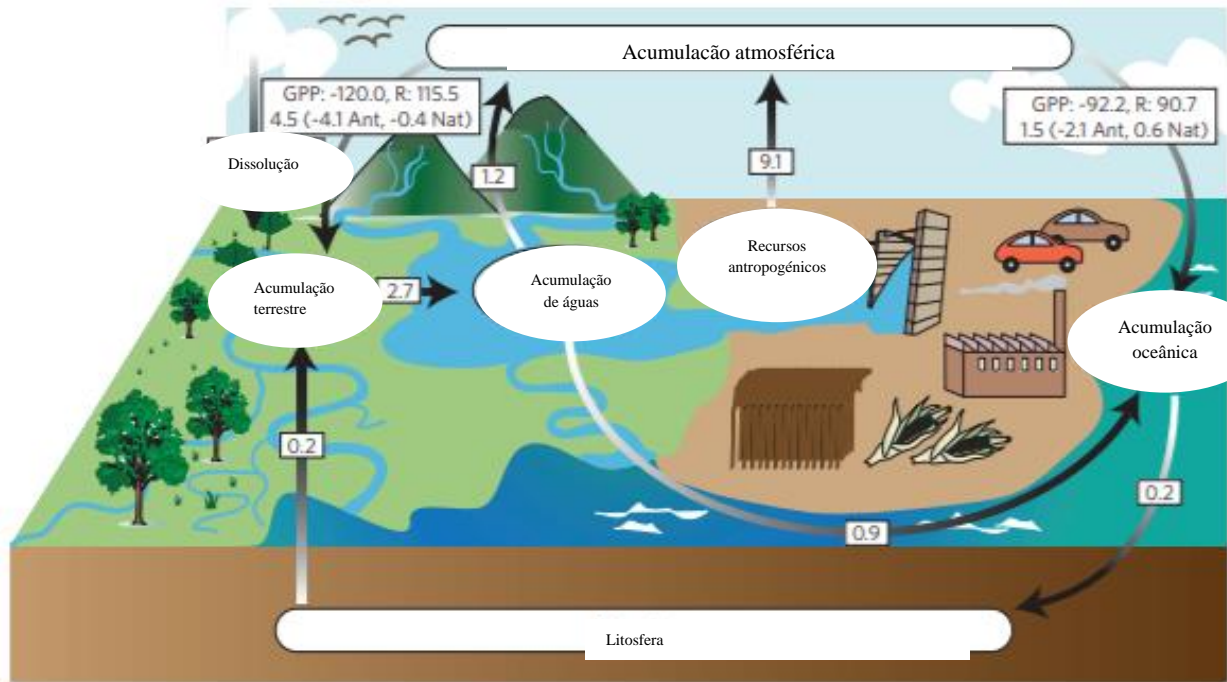


Figura 1.3: Esquema geral do ciclo de carbono, onde se pode observar as diferentes perturbações antropogênicas (acumulação terrestre, acumulação de águas interiores, recursos antropogênicos e acumulação oceânica) que contribuem para o aumento de CO₂ na atmosfera (Battin et al., 2009a).

Além da captura de CO₂ (Figura 1.4), o oceano tem também um papel muito importante na absorção de calor, captando cerca de 93% do calor adicional retido pelo aumento de GEE e diminuindo o aquecimento da superfície terrestre (Dias et al., 2020). Nos últimos anos observou-se um aumento no teor de calor oceânico (TCO) e prevê-se que este continue a favorecer o aumento do nível médio da água do mar (devido à expansão térmica), alterações na circulação e redistribuição oceânica, sendo esta última provocada por alterações de convecção e mistura a altas latitudes (Dias et al., 2020). Para compreender os impactos das alterações globais no planeta, é fundamental a existência de projeções que prevejam os futuros impactos das ações humanas e tentem minimizá-los ao máximo.

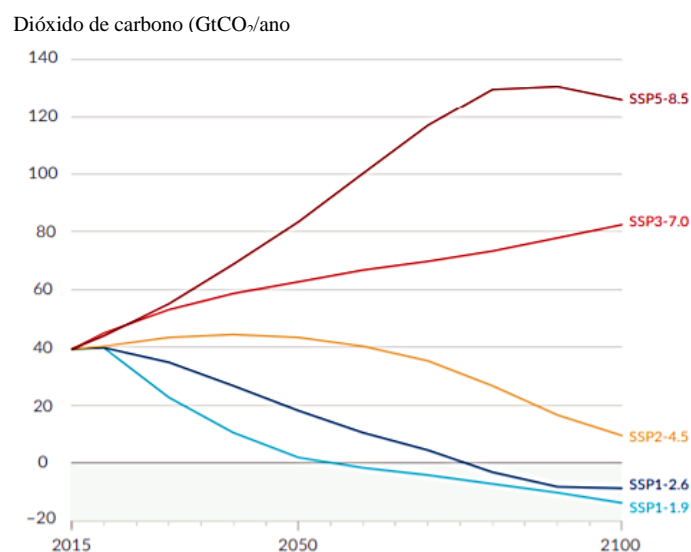


Figura 1.4: Projeção de alteração na concentração atmosférica de CO₂ desde 2015 até 2100 em função dos diferentes cenários SSP. Fonte: IPCC (2021).

1.2 Diminuição do oxigênio no oceano

Os níveis de oxigênio dissolvido têm diminuído desde meados do século XX, tanto em oceano aberto como nas águas costeiras (Breitburg et al., 2018). A redução de O_2 é uma consequência previsível face às alterações climáticas, pois o oxigênio é menos solúvel em água mais quente. Deste modo o aumento de temperatura prevista pelo IPCC (**Figura 1.5**) leva a uma redução de oxigênio dissolvido, e ao aumento da estratificação do oceano diminuindo o fornecimento de O_2 para o oceano profundo (Keeling et al., 2009).

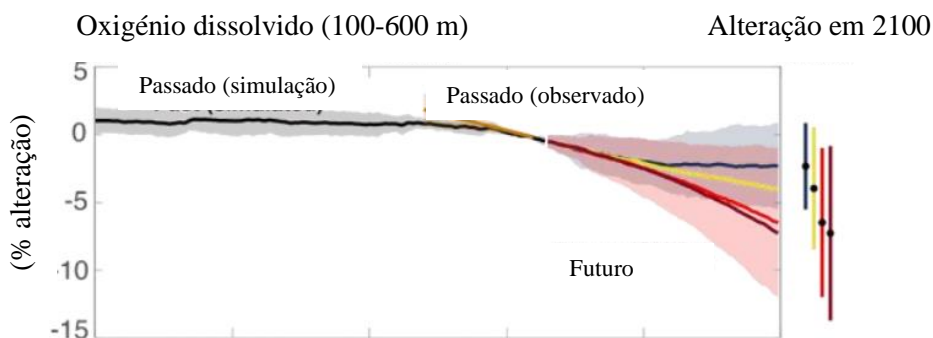


Figura 1.5: Representação dos cenários futuros segundo o IPCC, 2021 para a alteração do oxigênio dissolvido.

A limitação de oxigênio pode ser separada em duas categorias relativas à permanência e intensidade deste fator de *stress*, nomeadamente desoxigenação, e fenómenos de hipóxia (Diaz et al., 1995). A desoxigenação é caracterizada pela diminuição de O_2 crónica influenciada pelas alterações climáticas (Hughes et al., 2020). Adicionalmente, a diminuição de O_2 em certas regiões provoca frequentemente a ocorrência de “zonas mortas” (OMZ) (**Figura 1.6**) que podem ocorrer a profundidades intermédias ao longo da coluna de água, tanto em mar aberto como ao longo da costa (Diaz et al., 1995; Hughes et al., 2020). Por outro lado, os fenómenos de hipóxia são uma diminuição aguda dos níveis de oxigênio da água. Em termos práticos, a hipóxia é definida por 2-3 mg O_2/L em ambientes marinhos e estuários e abaixo dos 5-6 mg O_2/L nos restantes ecossistemas (Richards, 2009). A duração de exposição a estes fenómenos pode ter consequências graves na fisiologia dos organismos (Diaz et al., 1995). A hipóxia enquanto fenómeno, pode ser separado em três categorias:

- i. hipóxia na zona costeira, particularmente provocada pela eutrofização devido ao uso antropogénico do solo influenciado pelo uso humano (Hughes et al., 2020; Wu, 2002);
- ii. hipóxia em oceano aberto, provocado por alterações climáticas impulsionadas pela expansão das zonas mínimas de oxigênio (OMZ) (Hughes et al., 2020);
- iii. hipóxia causada por fenómeno natural, caracterizada por estratificação vertical como a formação de haloclinas e termoclinas (Wu, 2002).

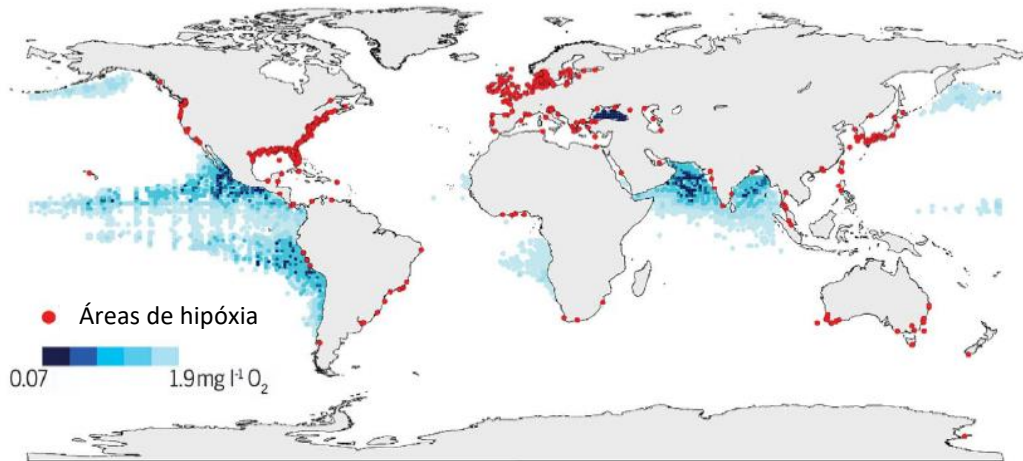


Figura 1.6: Representação de locais de zonas de reduzida concentração de oxigênio (principalmente na zona costeira do oceano Pacífico e zona costeira do oceano Índico) e zonas de hipoxia (distribuído junto à zona costeira dos continentes) ao longo de todo o globo (Breitburg et al., 2018).

O oxigênio é o elemento mais importante nos processos metabólicos de diferentes tipos de organismos. O O₂ molecular permite o metabolismo aeróbico e a reoxidação de diferentes espécies químicas reduzidas para o ciclo elementar essencial (Hughes et al., 2020). A relação entre a disponibilidade de oxigênio no ambiente e a taxa metabólica dos organismos é usada como indicador da tolerância à hipoxia (Seibel et al., 2014). Uma das métricas mais usadas para medir esta relação é a pressão parcial de oxigênio crítica (P_{crit}) definido como a tensão ambiental de O₂ onde a taxa de consumo de O₂ do organismo passa de independente do ambiente para dependente do O₂ ambiental (**Figura 1.7**). Deste modo, organismos com baixo P_{crit} são considerados tolerantes a baixos níveis de oxigênio ambiental. Quando os valores de oxigênio ambiental se aproximam do P_{crit}, os organismos apresentam uma resposta compensatória, improvisando a cedência de O₂ aos tecidos, provocando um aumento de produção glicolítica de ATP, onde o 6-fosfofructo-1-kinase (PFK-1) é central e limitante em todas as taxas glicolíticas (Richards, 2009).

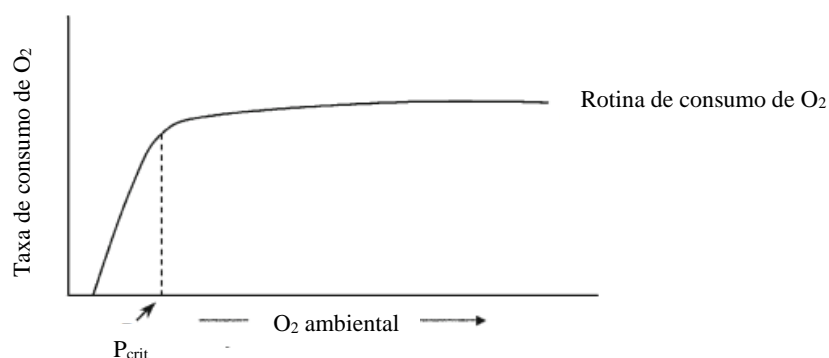


Figura 1.7: Respostas metabólicas às alterações de O₂ no ambiente. A tensão crítica de oxigênio (P_{crit}) de uma espécie é o ponto em que a taxa de consumo de O₂ passa a ser independente dos níveis ambientais de O₂ (frequentemente referidos como em conformidade com O₂) para ser aumentado, afetando negativamente a tolerância à hipoxia através do aumento de processos energeticamente caros como a reprodução, crescimento ou digestão. O P_{crit} também pode ser diminuído, aumentando a tolerância à hipoxia através de alterações na respiração, transporte/entrega de O₂, ou através de reduções em processos energeticamente caros como a reprodução, digestão e natação. Adaptado de Richards, 2009.

A inibição da produção de ATP (adenosina trifosfato) aerobicamente durante a exposição a períodos de hipóxia impõe uma limitação no organismo, limitando a sobrevivência deste, pois a produção de O_2 independente da produção de ATP é muito menos eficiente que a produção de ATP aeróbica. Esta limitação em espécies sensíveis à hipóxia, leva à inibição da via de metabolismo energético quando existe escassez de O_2 , provocando um desequilíbrio entre a baixa oferta de ATP e o consumo normal energético (Richards, 2009). De outra forma, em condição de normóxia, a produção de ATP é produzida pela fosforilação oxidativa na mitocôndria através da cadeia de transporte de elétrons (Farhat et al., 2021).

A resposta dos organismos à limitação de O_2 inclui a ativação da taxa glicolítica e expressão génica (ativação do fator de transcrição – HIF-1) (Storey & Storey, 2004). HIF são fatores de transcrição que respondem à alteração de oxigénio disponível, ligando-se a sequências específicas de DNA, controlando a transcrição génica. HIF-1 é o dímero induzido por resposta a situações de hipóxia, onde é ubiquitinado, promovendo o recrutamento de proteínas co-ativadoras para ajudar na adaptação dos organismos à diminuição de disponibilidade de O_2 (West, 2017). Os micróbios são um exemplo de adaptação a condições de hipóxia, onde estes utilizam o NO_3^- , MnO_4^- , $FeOH$, SO_4^{2-} e CO_2 como outros componentes recetores de elétrons, os quais são reduzidos a N_2 , Mn^{2+} , Fe^{2+} , HS^- e CH_4 , respetivamente. O sulfito, na forma de sulfeto de hidrogénio (H_2S), é um dos componentes reduzidos mais importantes no metabolismo bacteriano anóxico devido à sua ocorrência e alta toxicidade na vida de metazoários (Diaz et al., 1995).

No processo respiratório, os animais consomem cerca de 0.1-0.2% do oxigénio das células aeróbicas, convertido em ROS (espécies reativas de oxigénio), essenciais ao normal funcionamento das células e promovem a resistência a agentes patogénicos (Li et al., 2016; Parrilla-Taylor & Zenteno-Savín, 2011). A alta reatividade das moléculas, incluindo o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$) e o oxigénio (1O_2), consegue provocar danos membranares, oxidando os componentes celulares como proteínas, enzimas e DNA (Li et al., 2016; Parrilla-Taylor & Zenteno-Savín, 2011). As defesas oxidativas, incluindo componentes enzimáticos e não enzimáticos, são cruciais para o controlo da produção de ROS (Parrilla-Taylor & Zenteno-Savín, 2011). A superoxidase dismutase (SOD) converte o radical superoxidase (O_2^-) em peróxido (H_2O_2), a catalase (CAT) reduz o H_2O_2 em água, a glutathiona peroxidase (GPx) que desintoxica o H_2O_2 e a glutathiona-s-transferase (GST) é uma enzima antioxidante que contribui para a defesa celular contra os ROS (Li et al., 2016; Parrilla-Taylor & Zenteno-Savín, 2011).

Em condições de reduzida disponibilidade de O_2 , como a desoxigenação e hipóxia, a acumulação de elétrons contribui para a formação de ROS. Quando ocorre a reoxigenação, o oxigénio reage com os elétrons, na mitocôndria, e com os produtos acumulados pela degradação de produtos (como a hipoxantina e xantina), favorecendo um aumento da produção de ROS (Li et al., 2016; Parrilla-Taylor & Zenteno-Savín, 2011). A reação entre ROS e os lípidos, produz lípidos peróxidos, um dos principais marcadores de stresse oxidativo, causando frequentemente dano celular (Li et al., 2016). A peroxidação lipídica (LPO), indica o dano oxidativo celular, determinado pela quantificação de malondialdeído (MDA), um subproduto do dano lipídico, conforme o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Li et al., 2016; Lopes et al., 2018; Uchiyama & Mihara, 1978). O dano de DNA, 8-hydro-2'-deoxyguanosina, é o biomarcador mais comum para dano celular, o qual é associado a alterações na expressão das proteínas (Lopes et al., 2018). HSP70, é incluída na regulação positiva dos genes da família de proteínas de calor. Esta proteína citosólica é encontrada em diferentes organismos, trabalhando como chaperonas moleculares e prevenindo o desdobraimento da proteína (Rosa et al., 2013). A capacidade oxidativa total (TAC), é um equilíbrio dinâmico influenciado pelo constituinte antioxidante. Permite a proteção contra radicais livres e pode ser classificado em dois

grupos: preventivo (evita reações em cadeia dos radicais livres, reduzindo os hidroperóxidos) e divisores de cadeias antioxidantes (têm função de interromper a propagação da reação em cadeia) (Koracevic et al., 2001).

1.3 Repostas biológicas às alterações climáticas: fisiologia e comportamento

Vários estudos comprovam que a concentração de CO₂ dobrou relativamente aos anos da pré-industrialização, afetando a vida marinha (Hoegh-Guldberg et al., 2007; Sampaio et al., 2020). Espécies como o caso de equinodermes, briozoários e cnidários, revelam uma redução na calcificação, crescimento e sobrevivência face à diminuição do pH (Kwiatkowski et al., 2020), assim como a inibição da formação de aragonite (principal forma cristalina do carbonato de cálcio depositado nos esqueletos dos corais) (**Figura 1.8**) (Hoegh-Guldberg et al., 2007).

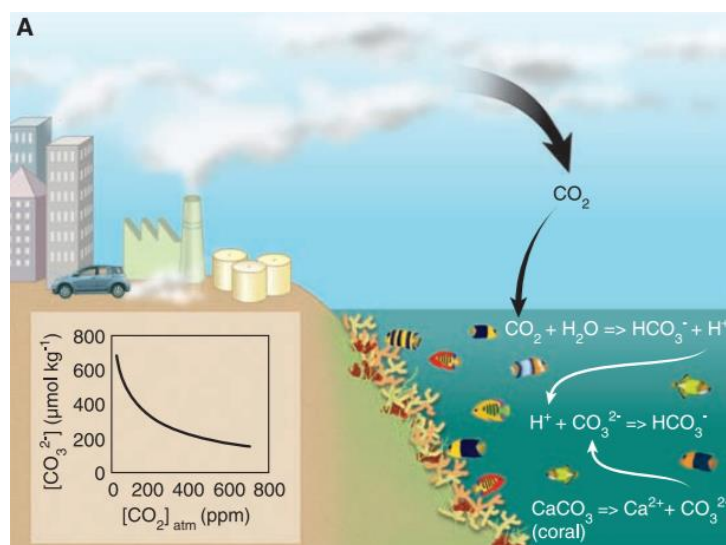


Figura 1.8: Ciclo de carbono, onde se observa a interferência antropogénica (CO₂) e a sua implicação na calcificação dos indivíduos. Fonte: (Battin et al., 2009a).

Com o aumento de temperatura atmosférica, o oceano tem consequentemente aumentado a sua temperatura. Este aquecimento traduz-se em efeitos negativos devido ao aumento da estratificação oceânica levando à diminuição da disponibilidade de nutrientes e consequentemente a redução da produção primária afetando o fitoplâncton e todos os níveis tróficos mais elevados, como o zooplâncton e grandes predadores (Kwiatkowski et al., 2020). Com as alterações climáticas, a concentração de O₂ irá diminuir e influenciar as respostas fisiológicas e comportamentais dos diversos organismos, principalmente os organismos aeróbicos obrigatórios, provocando; i) a diminuição de taxas de crescimento; ii) a redução de fecundidade (devido à redução de energia para a produção de gâmetas) e iii) e aumento de mortalidade (Breitburg et al., 2018; Hughes et al., 2020).

A exposição a diferentes tipos de stress nos organismos pode ter efeitos muito negativos, como o caso do aumento de temperatura que provoca uma diminuição na disponibilidade de oxigénio, levando simultaneamente, os organismos a terem maior necessidade no seu consumo devido à temperatura. Esta junção de fenómenos provocará uma alteração na distribuição de várias espécies de peixes e invertebrados que terão tendência para migrar em direção aos polos. O aumento de acidificação com a redução de O₂ irá provocar uma diminuição de várias espécies de peixes importantes para consumo humano (Breitburg et al., 2018). Diferentes organismos possuem diferentes limiares de resistência à falta de oxigénio, tendo este efeitos letais ou sub-letais (Hughes et al., 2020). Estes limites podem ser

equilibrados com a regulação da atividade enzimática através do metabolismo energético, como a regulação negativa de bombas de iões (Na^+/K^+ -ATPase) (Farhat et al., 2021). Uma adaptação chave encontrada em vários organismos expostos a fenómenos de hipóxia é a capacidade de depressão metabólica reversível, diminuindo a produção e consumo de ATP (Fago & Jensen, 2015).

A visão é um processo que se traduz essencial e metabolicamente exigente para os organismos. Neste processo, o oxigénio é essencial para o funcionamento de fotorreceptores e neurónios (que utilizam metabolismo oxidativo). Os olhos são estruturas associadas que requerem uma alta taxa de concentração de oxigénio. A limitação deste, pode traduzir-se em danos graves no desenvolvimento ocular dos indivíduos, principalmente quando esta limitação ocorre, durante a embriogénese, dificultando as trocas gasosas com o meio envolvente. Os cefalópodes (filo Molusca) apresentam uma grande complexidade visual, mas em contraste apresentam menor tolerância à limitação de oxigénio (Fig. 1.9) (McCormick & Levin, 2017).

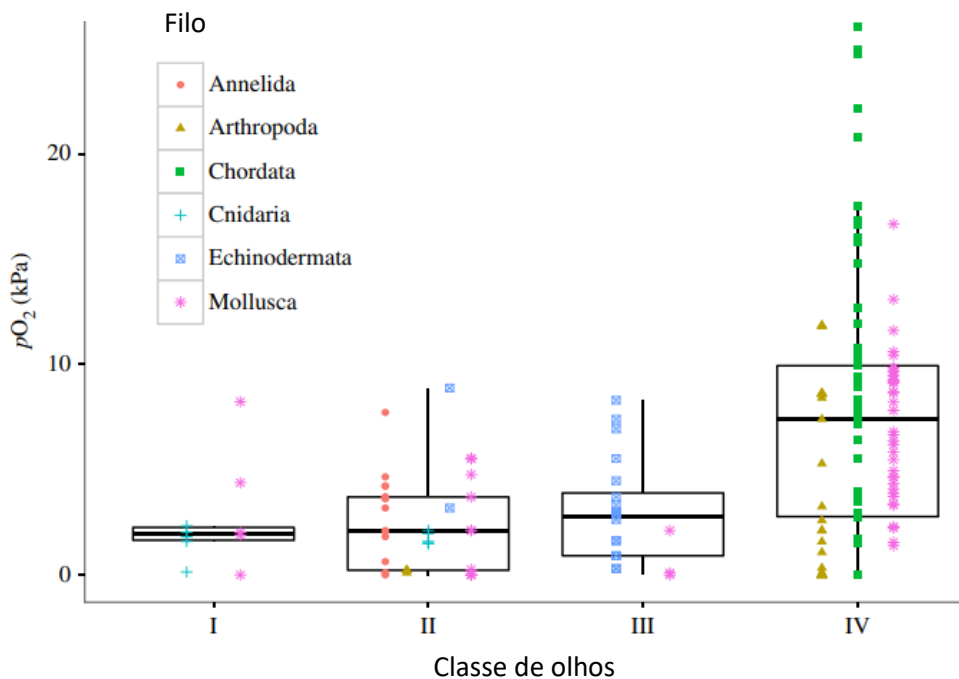


Figura 1.9: Tolerância à limitação de oxigénio das diferentes classes de complexidade do olho. Onde se observa que o filo molusca se apresenta como classe IV (mais complexa) mas também a que menor tolerância apresenta à diminuição do oxigénio. Figura adaptada de (McCormick & Levin, 2017).

A diminuição de oxigénio disponível é um fator importante para os limites fisiológicos ao nível visual, nomeadamente prejudicando a função fotorreceptora. Esta disrupção pode afetar os comportamentos dos indivíduos, a sua distribuição e interação com outras espécies. A diminuição de oxigénio, levou a uma despolarização da corrente celular como consequência da insuficiente produção de ATP em lulas (*Loligo pealii*), á redução do tamanho ocular em mexilhão (*Mytilus edulis*) e à disrupção do desenvolvimento ocular em peixe-zebra (*Danio rerio*) levando à ausência de olhos. (McCormick & Levin, 2017).

1.4 Biologia geral e ecologia da espécie *Sepia officinalis*

Os cefalópodes são invertebrados marinhos pertencentes ao filo Mollusca que foram encontrados pela primeira vez no final da Era Câmbrica (Castillo et al., 2015). A classe cefalópode pode ser classificada em duas subclasses: Nautiloidea, onde inclui dois géneros: Nautilus e Allonautilus, e a classe Coleoidea, onde inclui quatro ordens: Sepioidea, Teuthoidea, Octopoda e Vampyromorpha (Castillo et al., 2015). Estes organismos classificam-se como espécies oportunistas em ecossistemas temperados, revelando um nível trófico intermédio (Schickele et al., 2021). A sua alimentação baseia-se principalmente em comunidades bentónicas e demersais, tendo os mamíferos marinhos como principal predador na cadeia trófica. São caracterizados por possuírem uma taxa de crescimento rápido, entre 3-15% do peso corporal por dia e um ciclo de vida curto (2-4 anos) (Schickele et al., 2021). As alterações climáticas afetam as fases críticas da vida, como a diminuição do recrutamento, abundância e distribuição das espécies, influenciando a exploração sustentável e revelando uma importância económica (Schickele et al., 2021). A nível ocular os cefalópodes possuem dos sistemas nervosos centrais mais sofisticados nos invertebrados. Apresentam uma lobo ótico dividido em duas partes: córtex (onde este recebe os sinais visuais provenientes da retina) e a medula central, dividida em dois suportes (zona da coluna radial externa e zona tangencial central) (Liu et al., 2017).

A espécie *Sepia officinalis* inclui-se na ordem Sepiida, e na família Sepiidae, classificada por Linnaeus em 1758. Esta espécie é muito comum ao longo da costa portuguesa, distribuindo-se desde o oceano Báltico e oceano do Norte até ao sul de África (**Figura 1.10**) (Alves et al., 2006).

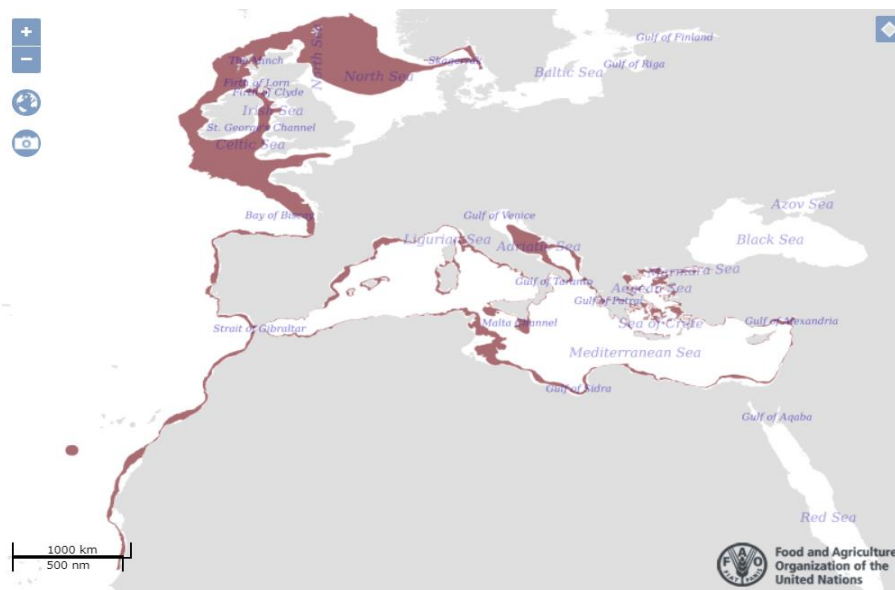


Figura 1.10: Distribuição geográfica de *Sepia officinalis*, maioritariamente na zona do norte da Europa. Fonte: FAO.

Quando os chocos eclodem, caracterizam-se como réplicas miniaturas dos adultos, tendo um comportamento similar aos adultos, caracterizados por um modo de vida bentónico (Darmaillacq et al., 2004). O desenvolvimento embrionário destes animais é influenciado pela temperatura. Em condições normais de saturação de oxigénio, este localiza-se entre os 40-45 dias aos 20°C, e 80-90 dias aos 15°C (Domingues P. M. et al., 2006). No ovo, casca flexível que atua como camada protetora e barreira para a difusão de gases respiratórios, os embriões encontram-se envoltos no fluido peri-vitelino (PVF). As trocas que ocorrem entre a água do mar e o PVF são limitadas e seletivas. Dentro do ovo ocorrem

flutuações ambientais ao nível do pO_2 e pCO_2 (Dorey et al., 2012). Os chocos são tipicamente constituídos por 8 braços curtos, que utilizam para diversas atividades, e adicionalmente 2 tentáculos longos que utilizam para captura de alimento (camarões, caranguejos e peixes) (Messenger, 1968).

Estes indivíduos caracterizam-se por serem um predador ativo, onde as presas são capturadas utilizando as ventosas existentes nas extremidades dos 2 tentáculos longos e extensíveis em que estes são disparados em direção à presa, capturando-a e trazendo para a boca (**Figura 1.11**). O ataque por partes dos indivíduos é iniciado e controlado pelo seu sistema de visão (Darmaillacq et al., 2004; Messenger, 1968).

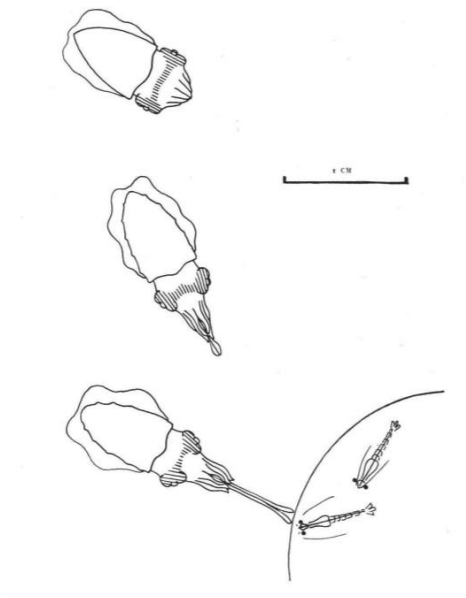


Figura 1.11: Esquema de ataque de *S. officinalis*. Primeiro o indivíduo encontra-se em repouso, depois deteta a presença da presa e move-se na sua direção, onde finalmente lança os seus dois braços extensíveis para capturar a presa. Fonte: (Wells, 1958).

Em contexto de laboratório, estes animais são muito comuns para experiências, devido ao seu elevado número de ovos, a sua alta taxa de sobrevivência, vida sedentária e tolerância ao manuseamento (Domingues et al., 2006). Nos primeiros dias após o nascimento, estes indivíduos necessitam de ser alimentados com presas vivas até começarem a aceitar presas congeladas (Darmaillacq et al., 2004; Messenger, 1968).

1.4.1 Cognição em cefalópodes

Os cefalópodes apresentam o sistema nervoso central mais sofisticado do mundo dos invertebrados, capaz de permitir a aprendizagem e memória possuindo um dos sistemas sensoriais mais avançados (Huang & Chiao, 2012; O'Brien et al., 2016). O cérebro do choco localiza-se entre os olhos sendo envolvido por um crânio cartilaginoso. O esófago atravessa o cérebro, dividindo-o em massas supraesofágicas (divididas em 3 lobos: frontal inferior, frontal superior e vertical), e massas subesofágicas (divididas em 3 lobos: anterior, médio e posterior) (Boycott, 1960). No lado peri esofágico existe um grande trato ótico composto por 3 estruturas: glândula ótica lobo olfatório e o lobo do pedúnculo (Boycott, 1960). Aprendizagem social é definida pela aprendizagem de algo influenciado pela observação/interação com outro animal ou produto (Heyes, 1994). Este comportamento pode

ocorrer por si mesmo ou devido a experiências sociais com o ambiente envolvente, como a tentativa-erro ou de uma forma mais complexa a experiência de outros indivíduos (Sampaio et al., 2020). Segundo (Heyes, 1994) neste tipo de aprendizagem, existem três categorias de experiências que podem realizadas:

- Estímulo simples: um objeto ou evento no meio ambiente;
- Relação entre dois estímulos;
- Relação entre a ação ou resposta dada pelo animal a um determinado estímulo.

A aprendizagem social define-se como aprendizagem por observação de outros indivíduos, permitindo aprender sem incorrer nos mesmo erros (Boal et al., 2000). A aprendizagem social é uma técnica frequentemente observada em animais sociais. Este tipo de aprendizagem tem o benefício do indivíduo observador poder economizar tempo e energia sem recorrer a tentativa-erro (Huang & Chiao, 2012; Sampaio et al., 2020). Os chocos, apesar de serem animais pouco sociais, apresentam capacidade de aprender socialmente a inibição do seu comportamento predatório na experiência de “*praw-in-tube*” (onde as presas são colocadas dentro de um tubo de vidro sendo apresentadas a um indivíduo que deve pela tentativa-erro aprender a inibir o seu comportamento predatório (Huang & Chiao, 2012; Sampaio et al., 2020).

1.4.2 Camuflagem

Em chocos, a camuflagem caracteriza-se por uma adaptação comum e taxonomicamente difundida que muitas espécies adotaram para reduzir a probabilidade de serem capturadas ou detetadas pelos predadores, podendo ocorrer em diferentes formas (Skelhorn & Rowe, 2016), como:

- Mosqueado – os animais assemelham-se a objetos comuns encontrados no ambiente.
- Correspondência com o fundo – os indivíduos recriam um padrão compatível com o padrão de fundo.
- Coloração disruptiva – os animais utilizam uma coloração disruptiva em que possuem marcas de alto contraste nas margens do seu corpo.
- Superfície disruptiva – os indivíduos recorrem à criação de margens-falsas, sendo estas mais salientes que a margem verdadeira do corpo.
- Distração disruptiva – o animal utiliza a coloração disruptiva possui pequenas marcas, isoladas e conspícuas que muitas vezes não são próximas às margens do corpo.
- Contra sombreamento – a superfície do corpo mais próxima da fonte de luz (normalmente superfície dorsal) é a cor mais escuro que a superfície do corpo.

Os cefalópodes conseguem criar um padrão que combine com o substrato. Estes indivíduos não combinam os detalhes do ambiente visual ponto a ponto, mas sim escolhem padrões de camuflagem que combinem com a textura visual principalmente dominante (Reiter & Laurent, 2020). Nos chocos a camuflagem é gerada por células da pele especializadas, chamados cromatóforos que contem pigmentos, e a sua expansão é controlada por neurónios motores localizados nos lobos dos cromatóforos (Reiter et al., 2018). Os chocos têm a particularidade de conseguir alterar os seus padrões de camuflagem relativamente rápido, via cromatóforos intradermais, quando são expostos a diferentes padrões (Reiter & Laurent, 2020). Esta rápida alteração nos cromatóforos acontece devido à expansão e retração dos pigmentos em resposta direta à atividade dos neurónios, projetados pelo cérebro, onde fazem conexões sinápticas com um conjunto de músculos (Reiter et al., 2018). Os cromatóforos podem ser separados em

três classes de profundidade de cores: amarelo (são mais baixos na derme), laranja (profundidade intermédia) e castanho-escuro (os mais profundos). Os chocos podem apresentar três diferentes tipos principais de camuflagem (**Figura 1.12**) (Chiao et al., 2015; Reiter & Laurent, 2020; Zylinski et al., 2009):

- Uniforme – caracterizada por pequeno ou nenhum contraste, entre o claro e o escuro.
- Mottle – composto por pequeno a moderado contraste entre o claro e o escuro distribuídos ao longo da superfície do corpo aleatoriamente.
- Disruptivo – caracterizado em larga escala pelo contraste entre componentes claros e escuros, com diferentes formas, orientações, escalas e contrastes, com bordas claras.

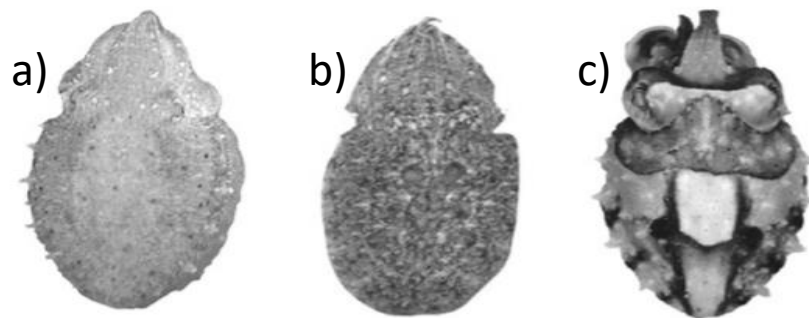


Figura 1.12: Representação das diferentes categorias de camuflagem em *S. officinalis*: a) uniforme; b) mottle; c) disruptivo. Fonte: (Barbosa et al., 2008)

Nos chocos, o padrão disruptivo é composto por distintos componentes claros e escuros. Para realizar a análise de componentes, são analisados três traços de intensidade extraídos da imagem do choco: traço longitudinal (flutuação no contraste de imagem), traço transversal do manto (flutuação da intensidade da imagem entre manto e cabeça) e traço transversal da cabeça (Chiao et al., 2015).

1.4.3 Impactos das alterações climáticas na espécie *S. officinalis*

As alterações climáticas podem ter um efeito nefasto em choco. Nomeadamente, o aumento de temperatura pode levar a alterações à sua distribuição e época de desova (Schickele et al., 2021) e a depressão metabólica durante a fase de pré-eclosão desta espécie (Rosa et al., 2013). Por outro lado, a exposição a cenários de acidificação dos oceanos provoca uma redução e atraso na taxa de desenvolvimento e crescimento embrionário. Isto traduz-se em taxas de crescimento menores (Gras et al., 2016), uma diminuição considerável no padrão de regulação dos genes envolvidos no consumo de energia (Gras et al., 2016), uma maior calcificação interna no seu osso (Sigwart et al., 2016), assim como uma menor flutuabilidade (Otjacques et al., 2020). Para além disso, comportamentos como predação, procura de abrigos e respostas a estímulos de perigo não demonstram alterações (Moura et al., 2019). Em relação à limitação de oxigénio que é um fenómeno cada vez mais recorrente não existe dada estudado face à sua influência no desenvolvimento destes indivíduos.

1.5 Objetivos

O objetivo desta dissertação é avaliar as respostas comportamentais e fisiológicas dos estádios iniciais de vida de choco (*Sepia officinalis*) face à exposição a concentrações limitadas de oxigénio, de

forma crónica ($7 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$) (desoxigenação) e de forma aguda apenas durante a noite, a dois níveis: 4 mg L^{-1} (hipóxia leve) e 2 mg L^{-1} (hipóxia severa).

Nomeadamente, será medido o efeito da redução de oxigénio:

- i. no tempo do desenvolvimento embrionário, tamanho dos recém-nascidos e o sucesso de nascimentos;
- ii. na aprendizagem associal e social;
- iii. na latência e capacidade de camuflagem;
- iv. no stresse oxidativo.

2 Material e métodos

2.1 Captura e aclimação de ovos de choco

Os ovos de *S. officinalis* foram capturados em Cascais (13/5/2021) e Algés (15/5/2021), por um pescador local, e transportados até ao Laboratório Marítimo da Guia (LMG) em Cascais.

Após a aclimação, os ovos foram colocados num sistema de circulação de água, com um reservatório de água comum e dois andares compostos por 4 banhos. Cada banho corresponde a um tratamento (controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa) com três pequenos tanques de plástico de 9L no seu interior (replicados). Todos os replicados encontravam-se ligados ao banho correspondente através de uma pequena abertura circular no topo de uma das paredes, tapados por uma fina rede. O banho do controlo recebia água diretamente do reservatório, enquanto os restantes tratamentos possuíam um cilindro ligado ao reservatório e consequentemente ligado aos tanques que permitia a circulação da água (**Figura 2.1**).

Os ovos recolhidos (434) foram distribuídos aleatoriamente pelos quatro tratamentos:

- Controlo – 8 mgO₂ L⁻¹ (155 ovos distribuídos entre 51-52 por replicado)
- Desoxigenação - Exposição crónica a redução de oxigénio para 7 mgO₂ L⁻¹ (100 ovos distribuídos entre 33-34 por replicado)
- Hipóxia leve - Exposição aguda a redução de oxigénio para 4 mgO₂ L⁻¹ durante a noite (94 ovos distribuídos entre 31-32 por replicado)
- Hipóxia severa - Exposição aguda a redução de oxigénio para 2 mgO₂ L⁻¹ durante a noite (85 ovos distribuídos entre 28-29 por replicado)

A água foi bombeada diretamente do oceano, filtrada por uma rede de 1µ e esterilizada por um esterilizador de 12W UV (Vecton 120 Nano, TMC-Iberia, Portugal), sendo continuamente renovada através do sistema pinga-pinga em cada banho. A água circulante foi oxigenada através de duas pedras de ar conectadas a um compressor de ar (Medo Blower LA-120A, Nitto Kohki, Japão).

Os quatro banhos estavam conectados a um reservatório de 270L, com uma bomba de 50W (TMC, V2 Power Pump, 3000L/h⁻¹) e duas bombas de 35W (TMC, V₂ Power Pump, 2150L/h⁻¹), um skimmer (Reef Skim Pro 400, TMC- Iberia, Portugal) e biobolas (Ouriço, Fernando Ribeiro bomba de 35W com fluxo de água cerca de 288-390mL.min⁻¹ (renovação a cada 30 minutos).



Figura 2.1: Sistemas aquáticos utilizados durante a experiência. São visíveis tanques replicados, colunas de desoxigenação, controladores e reservatórios de filtragem biológica.

O sistema foi iluminado através de quatro luzes LED de 8W, conforme o fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuro (6h20-20h20). A temperatura foi mantida através de um controlador de temperatura (HX-W3002, precisão $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, histerese 0.3°C) conectado a quatro termômetros de aquecimento de 150W (Eheim GmbH & Co KG, Alemanha) e um refrigerador de água (Hailea HC-150A).

Os níveis de oxigênio em cada tratamento foram controlados através de válvulas solenoides conectadas a um controlador Ardoxy (Mucha, S. 2022), um sistema automático de controlo de oxigênio através de sensores óticos de oxigênio (Pyroscience FireSting). As válvulas solenoides injetavam azoto (N_2) em forma de gás (Ar líquido, Portugal), para três reservatórios cilíndricos (que correspondiam a cada tratamento), com pedras de ar no interior para ajudar na recuperação de oxigênio e para ajudar a estabilizar os níveis de O_2 (**Figura 2.2**).

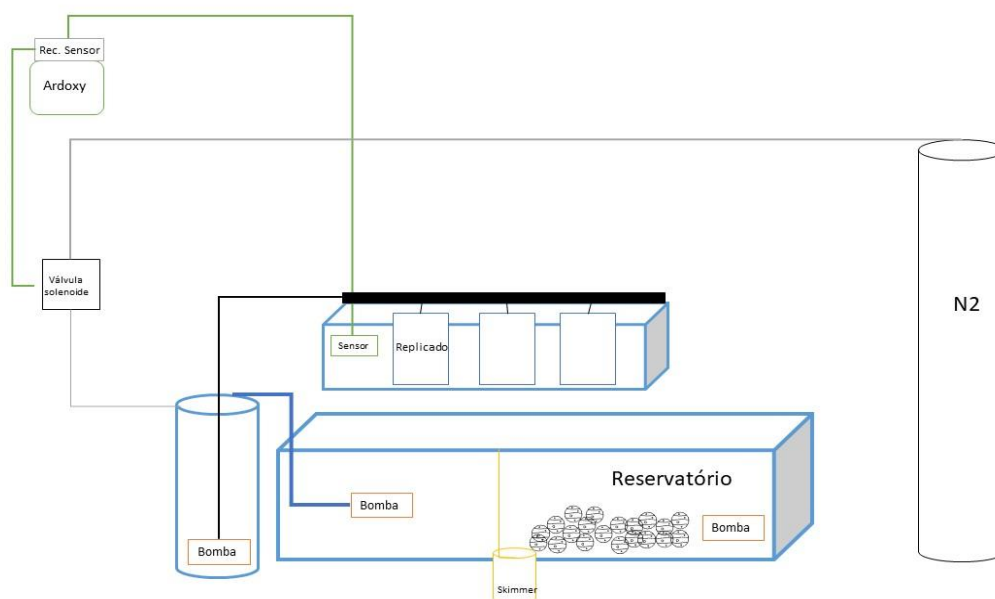


Figura 2.2: Esquema da circulação e incorporação de N_2 no sistema aquático e controlo de oxigênio.

A exposição aguda a níveis reduzidos de oxigénio, tinha início às 00h00 e terminava às 7h30 diariamente para simular a exposição noturna a eventos de hipóxia costeira, enquanto a exposição crónica funcionava continuamente. Durante a exposição aguda, a variação diária dos valores de O₂ (i.e. descida e subida) foi feita durante cerca de 30 minutos. Assim sendo, os valores alvo eram atingidos por volta das 00h30 e 8h00. Uma bomba de ar (Aqua One, Stellar 380D Series II) foi conectada a um temporizador para que funcionasse em oposição ao período de exposição aguda para permitir a aceleração na recuperação de O₂.

Os níveis de temperatura e oxigénio (oxímetro VWR DO220, precisão $\pm 1.5\%$, $\pm 0.3^\circ\text{C}$), salinidade (refratómetro Hanna, precisão ± 1 PSU) e pH (medidor de pH VWR pHenomenal, precisão ± 0.005), foram monitorizados duas vezes ao dia (às 7h30 durante o tratamento noturno e às 10h00 após a recuperação de oxigénio, **Tabela 2.1**).

Tabela 2.1: Parâmetros abióticos registados ao longo da experiência.

Parâmetros	Controlo		Desoxigenação		Stress Biológico		Hipóxia	
	Noite	Dia	Noite	Dia	Noite	Dia	Noite	Dia
Temperatura (°C)	18,05±0,13	18,13±0,15	18,05±0,15	18,12±0,13	18,08±0,08	18,11±0,11	18,06±0,16	18,1±0,15
pH	8,14±0,11	8,14±0,1	8,09±0,08	8,05±0,59	8,12±0,08	8,09±0,09	8,16±0,09	8,13±0,1
Salinidade	34,95±0,58	34,91±0,57	34,82±0,62	34,77±0,56	34,95±0,63	34,88±0,62	34,96±0,62	34,92±0,59
O ₂ (mgL ⁻¹)	7,77±0,11	7,98±0,12	7,02±0,82	7,19±0,21	4,24±0,4	7,85±0,13	2,33±0,85	7,78±0,27
O ₂ (%)	101,38±1,45	104,18±1,7	91,50±9,23	93,80±2,39	55,31±4,46	102,54±1,77	30,04±6,13	101,64±2,67
PCO ₂ (µatm)	463,8±102,4							
TA (µmol/kgSW)	2508,6±114,6							
TCO ₂ (mmol/kgSW)	2260,86±120,2							
HCO ₃ (mmol/kgSW)	2031,52±113,5							
Ω	2,86±0,71							

Os níveis de amónia, nitritos e nitratos foram monitorizados semanalmente, através de testes colorimétricos (TropicMarin, Hünenberg, Switzerland) e mantidos abaixo de 0.02 mg/L, 0.02 mg/L e 1 mg/L, respetivamente.

Após a eclosão, os indivíduos de choco foram colocados em copos individuais para que fosse possível a sua identificação (data de eclosão, número do indivíduo e replicado), sendo mantidos no tanque de plástico (replicado) correspondente. Os indivíduos foram alimentados após três dias da sua eclosão e no dia anterior à realização do teste de aprendizagem social.

2.2 Experiência de aprendizagem

As experiências de aprendizagem foram baseadas no procedimento de “presa no tubo” (Messenger, 1968) com modificações no procedimento de aprendizagem social do choco (Sampaio et

al., 2020), onde foi adicionada uma arena para que um segundo indivíduo (observador) pudesse observar o outro (demonstrador) a realizar a sua experiência de teste.

Os indivíduos (1 demonstrador e 1 observador), com idade entre os 3 e 7 dias, foram colocados na arena de experiência, uma caixa de acrílico aberta em cima com as dimensões 13.5 x 5.5 x 4 cm com uma divisória transparente no meio. A arena foi cheia com cerca de 200ml de água do tanque do indivíduo, antes de a experiência ter início. Todas as paredes da caixa foram previamente cobertas com plástico preto para evitar que os choccos conseguissem visualizar a experiências das caixas colocadas ao seu lado (**Figura 2.3**).

A experiência testou a inibição de ataque através de aprendizagem social, onde um indivíduo aprendeu a tarefa (demonstrador), enquanto outro indivíduo observava (observador). Foi colocada uma câmara de vídeo (Sony Handycam DCR-SR78 ou Canon Legria HF R56) num ângulo de aproximadamente 90° cobrindo a totalidade das arenas (um máximo de 6 arenas em cada câmara). As filmagens foram iniciadas assim que foi colocado o tubo de vidro com as duas presas no seu interior (anfípodes *Gammarus locusta*) na divisória do indivíduo demonstrador. Ambos os indivíduos eram deixados a observar o tubo durante 10 minutos, após esse tempo o tubo era retirado da arena. Após 10 minutos de descanso, o tubo era novamente colocado na arena. O processo foi repetido 10 vezes (Sampaio et al., 2020). Após um intervalo de descanso de 30 minutos, foi realizado o mesmo procedimento para o indivíduo observador. O critério para ser considerado sucesso na aprendizagem foi definido com uma sequência de três tentativas em que os indivíduos não apresentaram comportamento predatório (Sampaio et al., 2020).

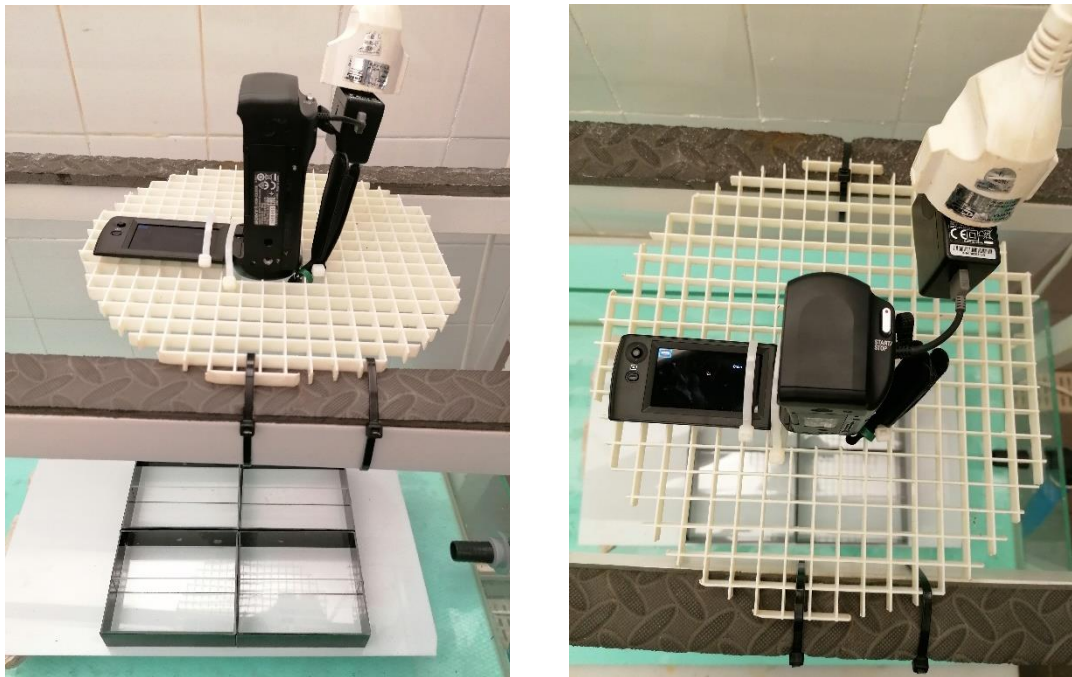


Figura 2.3: Arenas utilizadas para testes de aprendizagem associativa e aprendizagem social. A filmagem destes testes foi realizada pelo topo.

2.3 Experiência de Camuflagem

Os indivíduos, com idades entre os 1 e seis dias após eclosão, foram colocados recorrendo a uma colher preta, numa arena redonda branca com o fundo coberto com uma mistura de pedras (60% preto e 40% branco) (Fishnet, Portugal) para induzir o padrão disruptivo, ou em areia para induzir o padrão mottle (**Figura 2.4**). As arenas foram cheias com aproximadamente 400ml de água do replicado correspondente ao choco. A ordem em que foi realizada a exposição aos padrões foi alternada entre indivíduos. O número aleatório, exibido no vídeo, foi atribuído a todos os indivíduos para evitar o enviesamento de resultados por parte da pessoa observadora dos dados.

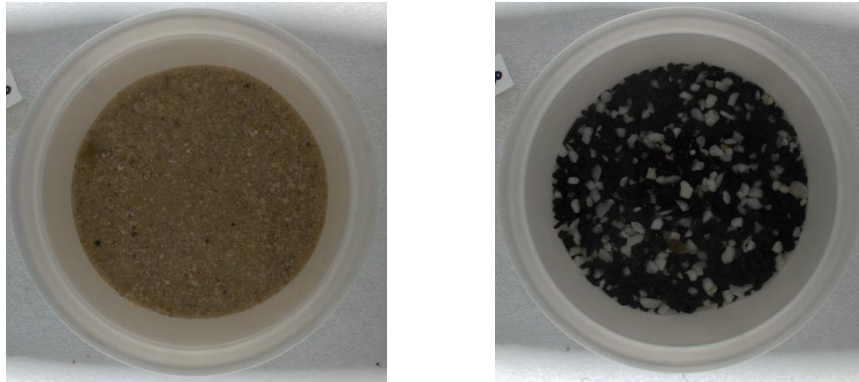


Figura 2.4: Arenas de areia (a) e da mistura de pedras (b) utilizadas durante a experiência de camuflagem.

Foi utilizada uma câmara de vídeo (GoPro Hero) para gravar a arena, num ângulo de aproximadamente 75°, durante 10 minutos após aclimação do indivíduo para registar as tentativas de enterro. As fotografias foram retiradas remotamente (**Figura 2.5**) (aplicação Canon Connect para telemóveis) em cada momento de alteração de padrão na camuflagem ou intensificação de padrão dos indivíduos (Canon PowerShot G7X Mark II, calibração de balanço de brancos, velocidade do obturador 1/15, F-stop f/11, ISSO 250, 1080p, 60fps) num ângulo de aproximadamente 90°. Ao mesmo tempo, o tempo de filmagem foi registado através de um cronómetro.

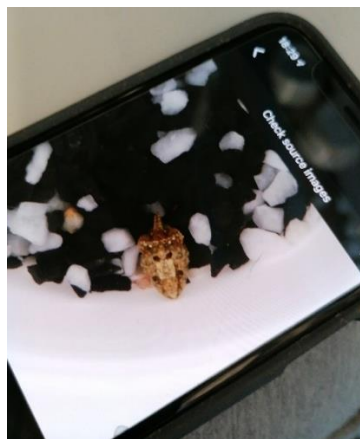


Figura 2.5: Captura remota de imagens para determinar características qualitativas e quantitativas da camuflagem dos chocos.

Foi medida a latência da camuflagem, i.e., tempo após aclimação até ser captada a fotografia em que a camuflagem era mais intensa em cada um dos substratos (mottle forte no substrato de areia e o padrão disruptivo no substrato de pedras). A intensidade do padrão disruptivo foi avaliada através da

diferença entre o valor máximo e mínimo de pixels (escala cinzenta) nos planos transversais e frontal do corpo.

As diferenças entre as regiões claras do choco (quadrado dorsal) e as pedras brancas, e a região escura do indivíduo e as pedras escuras foram avaliadas utilizando as diferenças de intensidade nas densidades integradas de pixels (escala cinzenta) (**Figura 2.6**).

As fotografias foram convertidas do formato CR2 para TIFF para serem lidas no software ImageJ.

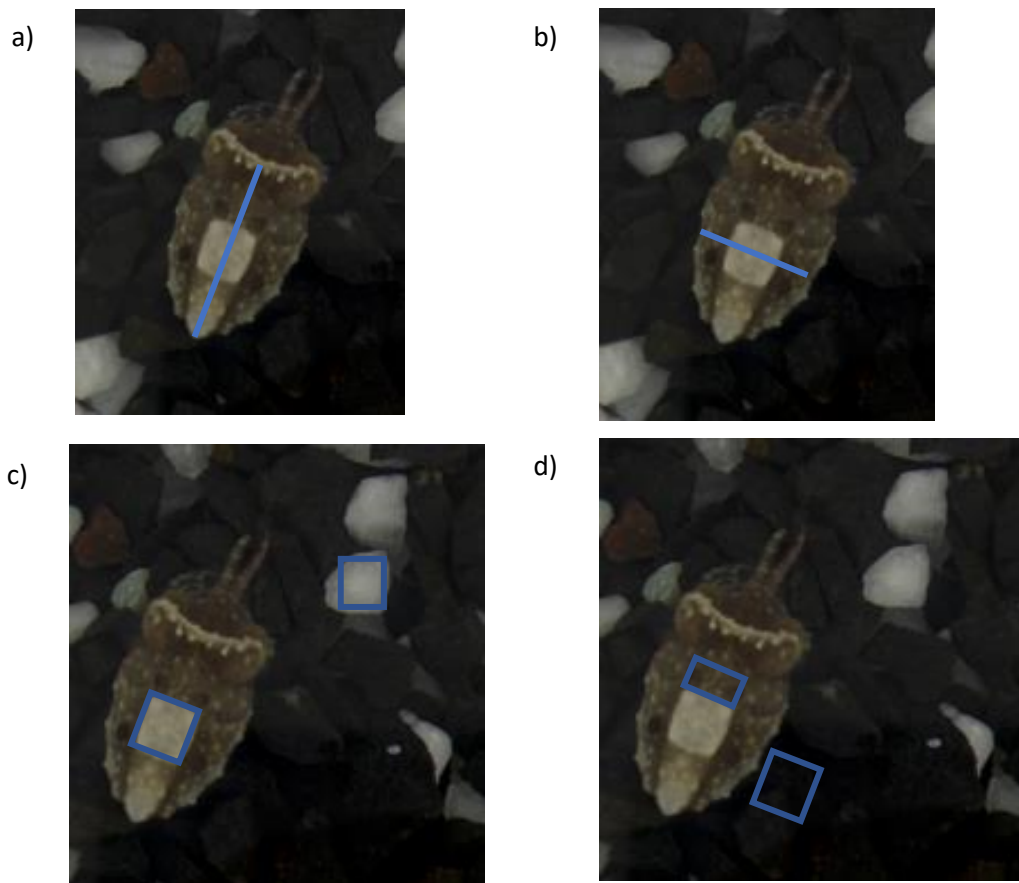


Figura 2.6: Representação da análise de intensidade de camuflagem: a) plano frontal; b) plano transversal; c) região clara do indivíduo comparado com as pedras brancas; d) região escura do indivíduo comparada com as pedras escuras

Para classificar a camuflagem, foi atribuído pontuações visuais, entre 0 e 2 em ambos os substratos (areia e pedra). Nas pedras i) pontuação 0 representa um indivíduo que apresenta um padrão de cor clara, ii) pontuação 1 representa indivíduos com um padrão disruptivo fraco (como por exemplo apenas os cantos do quadrado característico em cores claras) e iii) pontuação 2 representa um padrão disruptivo forte ou um corpo uniforme de cor escura. Na areia i) pontuação 0 representa indivíduos com uma coloração escura, ii) pontuação 1 representa indivíduos com um padrão mottle uniforme ou fraco e iii) pontuação 2 representa indivíduos que eram indistinguíveis em relação ao substrato (padrão mottle forte e pele texturada).

2.4 Análise de Biomarcadores

2.4.1 Preparação de extratos dos tecidos

As amostras foram retiradas do congelador e mantidas em gelo para manter a integridade das proteínas e atividade enzimática. Para a homogeneização das amostras, foi adicionado às amostras 1,0mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.4: NaCl, NaHPO₄, KH₂PO₄ e água (H₂O) milli-Q) e a mistura foi triturada recorrendo a um ultra-Turrax (Ultra-Turrax, Ika, Staufen, Alemanha). A preparação homogeneizada foi centrifugada (21.000 X durante 10 minutos a 4°C) e posteriormente o sobrenadante foi removido para um novo eppendorf e congelado a -80°.

2.4.2 Teor de proteína total

O teor de proteína total foi determinado seguindo o protocolo de (Bradford, 1976). A proteína sérica albumina bovina (BSA) foi diluída em água destilada para produzir padrões proteicos (diluições 1:2 de 0.0625 to 4 mg mL⁻¹) para obter a curva de calibração.

Foi adicionado aos padrões e às amostras (20 µL) 180µL do reagente de Bradford em cada poço das microplacas de 96 poços, em dois replicados. As absorbâncias foram lidas recorrendo a um espectrofotómetro (leitor multimodo Biotek Synergy HTX leitor multimodelo, USA) a 595nm. Nas amostras onde a concentração de proteína excedeu as 4mg mL⁻¹, as amostras foram diluídas 1:2. Foi criada uma curva padrão, linear, da concentração de proteína (eixo y) relativamente às absorvências (eixo x). Pontos que indicariam saturação face ao ensaio foram excluídos. A concentração de proteína foi calculada substituindo as absorvências na curva de calibração.

2.4.3 Atividade de Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi medida seguindo um protocolo adaptado de Sigma-Aldrich baseado em (Beers & chem, 1952). A calibração foi realizada utilizando 3mL de tampão fosfato de potássio (K₃PO₄; Sigma-Aldrich, Alemanha). Foi adicionado a amostra (100 µL) e 2,9mL de peróxido de hidrogénio (0.036 M H₂O₂; Sigma-Aldrich, Alemanha) a cada poço da microplaca de quartzo de 96 poços. A absorbância foi lida a 240 nm a cada 42 segundos durante 4 minutos. A atividade da catalase foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar (0.04 µM⁻¹cm⁻¹) de H₂O₂ seguindo a expressão:

$$\text{Atividade de Catalase (nmol min}^{-1}\text{ mL}^{-1}) = \frac{\Delta\text{Abs (240nm)/min}}{0.04} \times \frac{\text{Volume Total}}{\text{Volume Amostra}}$$

Os resultados foram expressos relativamente ao teor de proteína total (nmol/min/mg total de proteína).

2.4.4 Glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da glutathiona S-transferase foi determinada seguindo o método de Habig et al., 1974. A solução de substrato foi preparada a partir de 9,8mL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (Sigma), 0,1mL de glutathiona reduzida (200 mM em água milli-Q [MQW]) e 0,1mL de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (100 mM em 95% de etanol). Esta solução foi adicionada a microplacas de 96 poços (180µL) com 20µL de amostra em cada poço, e as absorbâncias foram lidas a 340nm a cada minuto, durante 6 minutos. A diminuição da absorbância foi calculada com recurso à expressão:

$$\Delta\text{ABS}_{340}/\text{min} = \frac{\Delta\text{ABS}(T_2) - \Delta\text{ABS}(T_1)}{T_2 - T_1}$$

A atividade de GST foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar para cDNB de $0,0052 \mu\text{M}^{-1}$ a 340nm, de acordo com a expressão:

$$\text{Atividade de GST (nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}) = \frac{\Delta\text{ABS}/\text{min}}{0.0053/\mu\text{M}} \times \frac{\text{Volume Total}}{\text{Volume Amostra}}$$

O resultado foi expresso de acordo com o total de proteína ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$).

2.4.5 Teor de Malondialdeído (LPO)

O teor de MDA nas amostras foi medido em relação às concentrações padronizadas, previamente preparadas (0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 e $0.1 \mu\text{L}$ de MDA) em água Milli-Q.

Em microtubos de 1mL foi adicionado $5 \mu\text{L}$ de cada solução padrão ou amostra, $45 \mu\text{L}$ de tampão fosfato de sódio monobásico (50mM em água milli-Q, pH 7-7.4), $12,5 \mu\text{L}$ de sulfato de sódio (8.1% em água Milli-Q), $93,5$ de ácido tricloroacético (20% em água Milli-Q, pH 3.5), $93,5 \mu\text{L}$ de ácido tiobarbitúrico (1% em água Milli-Q, centrifugada onde foi dissolvido um comprimido de hidróxido de sódio) e $0,5 \mu\text{L}$ de água Milli-Q à mistura. A mistura foi homogeneizada durante 30s e incubada em banho-maria a ferver (100°C) durante 10 minutos. Posteriormente a mistura foi colocada em gelo durante 5 minutos e adicionados $62,5 \mu\text{L}$ de água Milli-Q e $312,5 \mu\text{L}$ de n-butanol piridina aos microtubos e centrifugados a 2000x durante 5 minutos. O sobrenadante ($\sim 150 \mu\text{L}$) foi removido e colocado em microplacas de 96 poços. As absorbâncias foram lidas a 530nm (Biotek Synergy HTX leitor multimodelo, USA). Foi seguido o protocolo Ohkama et al., 1979.

2.4.6 Teor total antioxidante (TAC)

A TAC foi determinada seguindo o protocolo de Kambayashi et al., 2009. A cada poço das microplacas de 96 poços foi adicionado sequencialmente $10 \mu\text{L}$ de amostra, $10 \mu\text{L}$ de mioglobina ($90 \mu\text{M}$ de tampão fosfato), $150 \mu\text{L}$ de ABTS – 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($600 \mu\text{M}$ em água Milli-Q) e finalmente $40 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio ($500 \mu\text{M}$ – Trolox 1.5mM em tampão fosfato). As microplacas incubaram envolvidas em folha de alumínio durante 5 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi lida a 410nm (Biotek Synergy HTX leitor multi-modelo, USA). A curva de calibração foi inferida a partir do teor de TAC, com base na série Trolox ($0-220 \mu\text{L}$) e expressa de acordo com a proteína total das amostras (mL mg^{-1} de proteína total).

$$\text{Antioxidante (mM)} = \left(\frac{\text{Média das absorbâncias das amostras} - (\text{interceção} - y)}{\text{Declive}} \right) \times \text{Diluição}$$

2.4.7 Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi determinada seguindo o protocolo de (Lawrence & Burk, 1976). Às placas de 96 poços, foi adicionado $120 \mu\text{L}$ de mistura tampão (50 mM fosfato, pH 7.4, com 5 mM EDTA [ácido etilenediaminetetracético]) ($140 \mu\text{L}$ para limpar os poços), $50 \mu\text{L}$ de solução do substrato ($0.8 \text{ mM } \beta\text{-NADPH}$, 4 mM de glutathione, 4 U mL^{-1} glutathione reduzida, e 4 mM sódio) e $20 \mu\text{L}$ de amostra. Posteriormente foi adicionado $20 \mu\text{L}$ de hidroperóxido de cumeno ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$) a cada poço. A microplaca

foi agitada lentamente para misturar o conteúdo e foi lido a 340nm (Biotek Synergy HTX leitor multi-modelo, USA) a cada minuto, durante 6 minutos. A atividade de GPx foi determinada utilizando o coeficiente de extinção de β -NADPH seguindo a expressão:

$$\text{Atividade de GPx (nmol/min/mL)} = \left(\frac{\Delta\text{ABS}_{340} / \text{min} * V (\text{mL}) * \text{dil}}{0.00373 * V_{\text{amostra}} (\text{mL})} \right)$$

O resultado foi dado em relação à proteína total (nmol min⁻¹ mg⁻¹).

2.4.8 Superoxidase dismutase (SOD)

A inibição da atividade de SOD foi determinada seguindo o método de (McCord & Fridovich, 1969). Na microplaca de 96 poços foi adicionado sequencialmente a cada poço 200 μ L de solução tampão (0.5mM fosfato de sódio (K₃PO₄) pH~8.0, Sigma-Aldrich, Alemanha), 10 μ L de EDTA (3mM ácido etilenediaminetetracético, Riedel de Haën, Alemanha), 10 μ L de xantina (3mM, Sigma, Alemanha), 10 μ L de NBT (0.75mM Sigma-Aldrich, Alemanha) e por fim 10 μ L de amostra. A reação foi iniciada adicionando 10 μ L de 100mU de xantina oxidase (XOD, Sigma-Aldrich, Alemanha). A absorbância foi lida a 560nm a cada 2 minutos durante 20 minutos (Biotek Synergy HTX leitor multi-modelo, USA). Os resultados da atividade SOD foram expressos em percentagem de inibição/ mg⁻¹ total de proteína⁻¹ e foram calculados utilizando a expressão:

$$\% \text{ inibição de SOD} = \left(\frac{\Delta\text{ABS}/\text{min do controle} - \Delta\text{ABS}/\text{min da amostra}}{\Delta\text{ABS}/\text{min Controle}} \right) \times 100\%$$

2.4.9 Proteína choque de calor 70 (HSP70)

Os níveis de proteína de choque térmico (HSP70) foram determinados através do procedimento ELISA (ensaio de imuno-absorção enzimática), de acordo com o procedimento descrito por (Njemini et al., 2005). As soluções padrão foram preparadas de 0,0078 a 2 mL⁻¹ de HSP70 (diluições 1:2 em tampão PBS).

As amostras foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços e incubadas durante a noite a 4°C (cobertas com papel de alumínio). No dia seguinte, a microplaca foi lavada três vezes utilizando PBS (contendo 0,05% de TWEEN-20) e foi adicionada a solução de bloqueio (200; 1% BSA [A proteína sérica albumina bovina, Sigma-Aldrich, USA] em PBS). A microplaca foi coberta com papel de alumínio e incubada a 4°C durante a noite no frigorífico. A microplaca foi lavada novamente três vezes com PBS. De seguida, foi adicionado 50 μ L de anticorpo primário a cada poço. Voltou-se a cobrir a microplaca com papel de alumínio e incubou-se a 4°C durante toda a noite. No dia seguinte, a microplaca foi lavada três vezes com PBS para remover os anticorpos não ligados, e adicionou-se o anticorpo primário diluído a cada poço, e posteriormente foi adicionado o segundo anticorpo conjugado com fosfatase alcalina (anti-ratinho IgG Fc específico, Sigma-Aldrich, Alemanha). A microplaca foi coberta com papel de alumínio e incubada a 37°C durante 90 minutos, antes de ser lavada novamente.

Foi adicionado o substrato de fosfatase alcalina (100 μ L; 100mM NaCl; Panreac, Espanha, MgCl₂ (50 nM Sigma-Aldrich, Alemanha), Tris-HCl (100 mM; Sigma-Aldrich, Alemanha) e PnPP (27 mM; pH 8.5, 4-nitrofenilfosfato de sódio de sal hexahidratado; Sigma, Alemanha) à microplaca. De seguida foi embrulhada em papel de alumínio e deixada a incubar durante 30 minutos no agitador à temperatura ambiente. Finalmente foi adicionado 50 μ L de solução STOP (3M; NaOH; Panreac, Espanha) a cada poço da microplaca e a absorbância foi lida a 405nm (Biotek Synergy HTX leitor multi-

modelo, USA). Os resultados de HSP70 foram normalizados com o teor de proteína total da amostra e expresso em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de proteína total⁻¹.

2.4.10 Teor de OHdG (Dano de DNA)

Como biomarcador de dano oxidativo de DNA, 8-OHdG (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) foi quantificado seguindo o método escrito por (Shen et al., 2007) seguindo o método ELISA. As amostras (100 μL) foram adicionadas à microplaca de 96 poços e incubadas durante toda a noite a 4°C. Após 24h a microplaca foi lavada quatro vezes com PBS TWEEN-20 (0,05%) e incubada com 200 μL de solução de bloqueio (BSA) à temperatura ambiente durante 90 minutos. Após outra lavagem, foi adicionado 50 μL de anticorpo primário (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; anti-OHdG, Sigma-Aldrich, Alemanha) e a microplaca incubada durante toda a noite a 4°C. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas quatro vezes com PBS-TWEEN 20 (0,5%) para eliminar os anticorpos não ligados e foi adicionado o anticorpo secundário (solução conjugada alcalino-fosfatase com anti-ratinho IgG, Sigma-Aldrich, USA). A microplaca foi incubada a 37°C durante 90 minutos. Após outro procedimento de lavagem, foi adicionado o substrato e deixado a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, a reação foi interrompida adicionando 100 μL de NaOH 3mM e as absorbâncias lidas a 405nm (Biotek Synergy HTX leitor multi-modelo, USA). Os resultados foram expressos de acordo com o total de proteína (abs mg^{-1} de proteína total⁻¹).

2.5 Análise Estatística

O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas em RStudio, versão 4.1.2. A Análise exploratória de dados e a validação de modelos foram realizadas recorrendo à biblioteca HighstatLibV10 R da Highland Statistic (Zuur et al., 2009). A exploração dos dados foi realizada seguindo o protocolo de Zuur et al., 2016 para a exploração de dados. Dois tipos de análise diferentes foram utilizados consoante o tipo de dados, nomeadamente análise de sobrevivência (quando os dados são truncados ou censurados), aplicável ao sucesso de eclosão e aprendizagem social e associativa, e modelos lineares generalizados mistos nos restantes casos.

2.5.1 Análise de sobrevivência

O sucesso de eclosão, aprendizagem associativa e social (demonstrador e observador, respetivamente), foram avaliadas recorrendo a análises de sobrevivência. No caso do sucesso de eclosão a incorporação de efeitos mistos não permitiu testar as premissas do modelo, foi ajustado aos dados de sucesso de eclosão um modelo de regressão linear de proporção de Cox (“coxph”, do pacote sobrevivência do R). Os dias até eclosão e eclosão bem-sucedida (nascimento) (fator binário 0/1) foram considerados como co-variáveis. O modelo foi ajustado por máxima verossimilhança, sendo o tratamento considerado como variável fixa (como fator de quatro níveis – controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa). As suposições do modelo linear “coxph” (modelo linear sem influencia de observador e linearidade de co-variáveis) não foram cumpridas (teste de Schoenfeld dimensionado em relação ao tempo), assim, foi ajustado o modelo “survdiff”. Foram realizadas múltiplas comparações post-hoc (“pairwise_survdiff”) e os valores de p foram ajustados através da correção de Bonferroni-Hochberg. A curva de sobrevivência foi realizada com recurso ao gráfico plot Kaplan-Meier (função “ggsvplot”, do pacote R “survminer”).

Quanto à aprendizagem associada e social (demonstrador e observador, respectivamente) foram avaliadas recorrendo a análises de sobrevivência. Os modelos utilizados foram o de regressão linear proporcional de Cox (“coxph”, pacote R) e foram ajustados por máxima verossimilhança. Todos os modelos assumiram um tratamento como um fator de quatro níveis e o número de tentativas para aprender e sucesso de aprendizagem (0/1) foram tratadas como variáveis de resposta. As regressões lineares proporcionais dos modelos “coxph” não foram cumpridas (teste de Schoenfeld, representando um gráfico em espinha suave dos resíduos de Schoenfeld dimensionado em relação ao tempo), assim, foram utilizados os modelos “survdiff”. Foram realizadas análises de comparações múltiplas post-hoc (“pairwise survdiff”) e os valores de p ajustados por meios das correções de Bonferroni-Hochberg. As curvas de sobrevivência foram realizadas recorrendo ao gráfico plot de Kaplan-Meier (função “ggsurvplot” do pacote R “survminer”).

2.5.2 Modelos lineares generalizados mistos

Foram utilizados um modelo misto linear generalizado (GLMM, utilizando um modelo Template Builder função “glmmTMB” do pacote “glmmTMB”; Brooks et al., 2017), utilizando distribuição gaussiana para avaliar o comprimento do manto dos choccos, tempo de latência ao ataque, tempo de latência à camuflagem, análise do padrão disruptivo e as variáveis fisiológicas TAC, LPO, HSP70, Catalase, GPx, GST, SOD e dano de DNA. A distribuição binomial negativa foi usada para análise do número de ataques, a binomial para tentativa de enterrar e a poisson para pontuação da camuflagem. O tratamento foi considerado como fator de quatro níveis (efeito fixo), com os replicados como o fator de três níveis (efeito misto), em função do comprimento do manto (variável de resposta contínua). Foi realizado um teste de qui-quadrado de Wald tipo II para avaliar a influência dos tratamentos no comprimento do manto (função “Anova” do pacote “car”; Fox e Weisberg, 2011). Foi realizada análises de comparação múltiplas de post-hoc (“emmeans”) e o valor de p ajustado por meio da correção de Tukey. As premissas do modelo GLMM foram verificadas (normalidade, homocedasticidade e independência de resíduos, usando a função “model performance” do pacote “performance”; Lüdtke et al., 2021).

3 Resultados

3.1 Sucesso de eclosão e tamanho do manto

A redução de oxigénio afetou significativamente o sucesso de eclosão dos indivíduos ao longo do tempo (**Figura 3.1**). O sucesso de eclosão do controlo foi de 87,74%, desoxigenação 80,00%, hipóxia leve 87,23% e a hipóxia severa 80,00%, com um $n_{\text{Total}} = 434$, $n_{\text{nascimentos_controlo}} = 136$, $n_{\text{nascimentos_desoxigenação}} = 80$, $n_{\text{nascimentos_hipóxia leve}} = 82$ e $n_{\text{nascimentos_hipóxia severa}} = 68$; $\chi^2 = 18,766$; d.f= 3; $p < 0,001$. A análise revelou uma diferença significativa entre o controlo e hipóxia severa ($p < 0,001$), entre desoxigenação e hipóxia leve ($p < 0,01$) e entre hipóxia leve e hipóxia severa ($p < 0,01$). A exposição à hipóxia severa causou um atraso no desenvolvimento cerca de 30% dos chocos eclodidos.

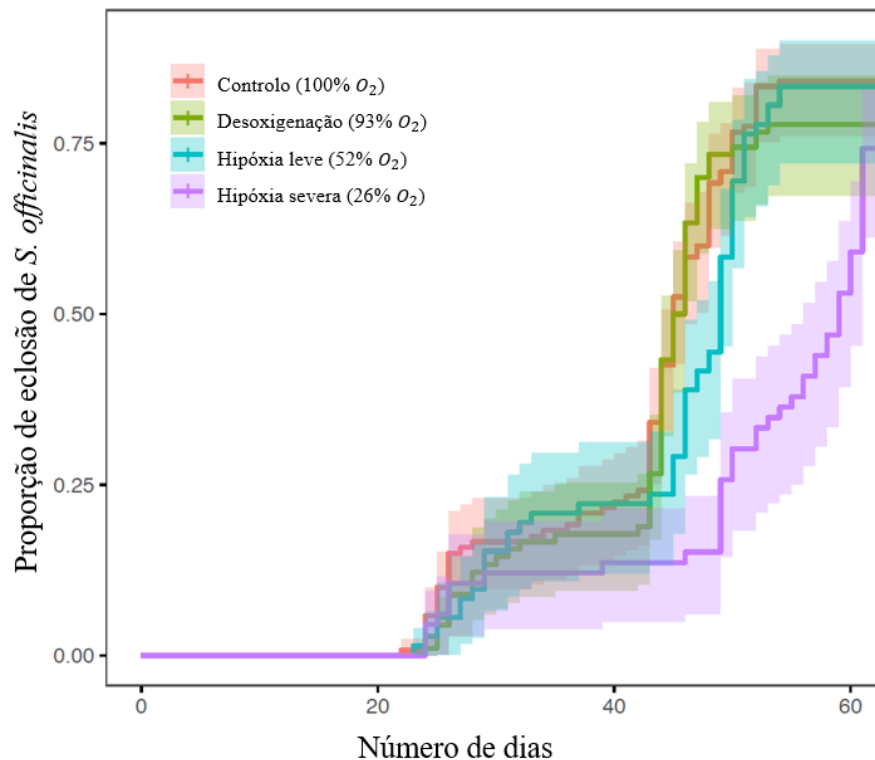


Figura 3.1: Proporção de eclosão de *S. officinalis* em função do número de dias nos diferentes tratamentos, controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa. As linhas representam a proporção de eclosão dos chocos, as áreas a sombreado representam intervalos de confiança de 95%.

Ademais, quando expostos a hipóxia severa, chocos recém eclodidos apresentam uma redução significativa do tamanho do manto (**Figura 3.2**) ($\chi^2 = 23,947$; d.f= 3; $p < 0,001$).

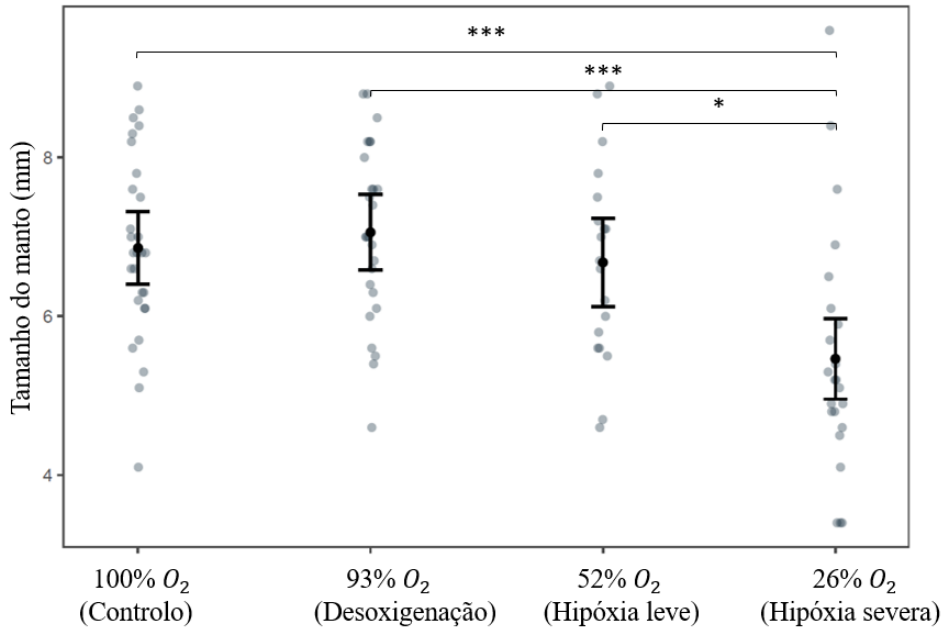


Figura 3.2: Tamanho do manto de chocos recém eclodidos expostos a diferentes tratamentos de redução de oxigénio. Os pontos cinzentos representam os valores obtidos, os pontos pretos a médias previstas transformadas do modelo, as barras representam intervalos de confiança (95%) do modelo.

3.2 Testes de aprendizagem

No teste de aprendizagem associada não foram observadas diferenças significativas entre os diversos tratamentos (**Figura 3.3**, $\chi^2 = 2,8396$; d.f= 3; $p = 0,417$).

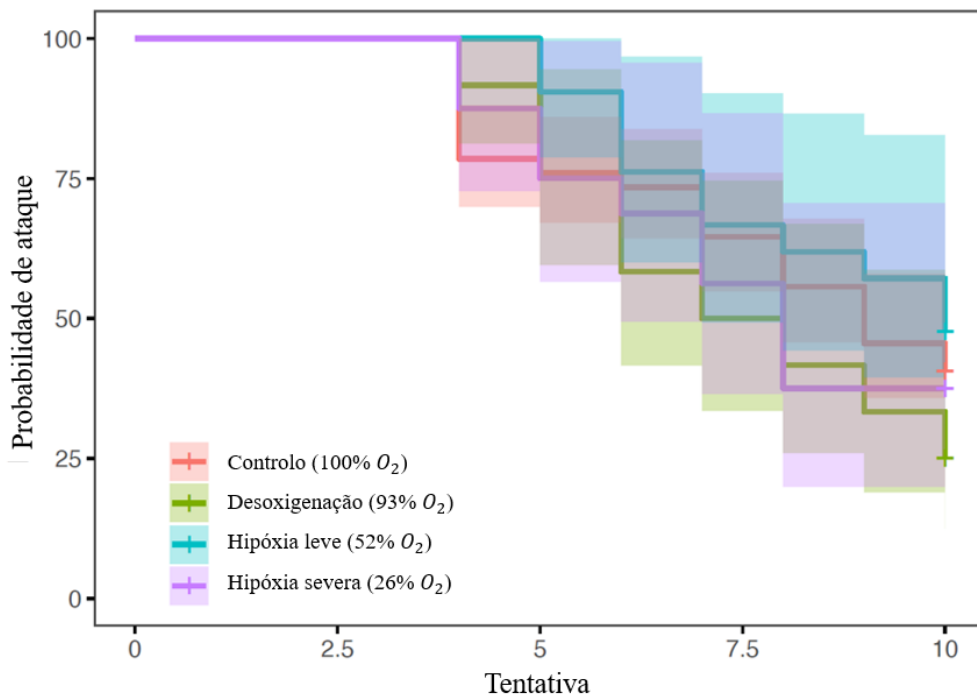


Figura 3.3: Probabilidade de ataque à presa no tubo em função do número de tentativas no teste de aprendizagem associada em chocos expostos aos diferentes tratamentos, controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa.

Quanto ao teste de aprendizagem social, a utilização de um demonstrador exposto ao tratamento equivalente ao do observador não demonstrou diferenças significativas face à utilização de um demonstrador proveniente do controlo (**Figura 3.4a**, $\chi^2 = 0,0041$; d.f= 1; $p= 0,949$). Contrariamente, no teste de aprendizagem social, chocos expostos a hipóxia severa diminuíram a sua probabilidade de ataque mais rapidamente do que os expostos a outras condições (**Figura 3.4b**, $\chi^2 = 21,625$; d.f= 3; $p<0.001$).

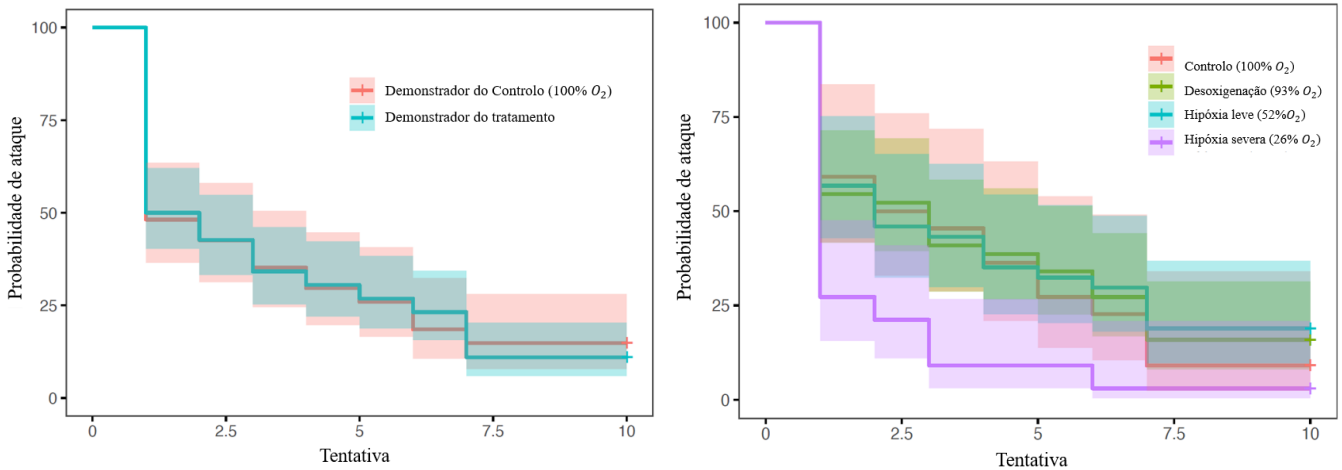


Figura 3.4: Probabilidade de ataque à presa no tubo em função do número de tentativas no teste de aprendizagem social. A) de chocos que observam demonstradores provenientes do mesmo tratamento dos observadores e de chocos que observaram demonstradores provenientes do controlo. B) em chocos expostos aos diferentes tratamentos, controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa, independentemente da proveniência do demonstrador. As linhas representam a probabilidade de ataque, as áreas a sombreado representam intervalos de confiança a 95%.

O número de ataques efetuados por demonstradores diminuiu significativamente em interação entre tratamento e tentativa (**Figura 3.5a** $\chi^2 = 7,9967$; d.f= 3; $p<0.05$). Por outro lado, o número de ataques efetuados por observadores existiu uma pequena redução entre tratamento e tentativa, havendo, no entanto, uma quase inexistência de ataques por parte de indivíduos provenientes do tratamento de hipóxia severa (**Figura 3.5b** $\chi^2 = 13,8590$; d.f= 3; $p<0.01$).

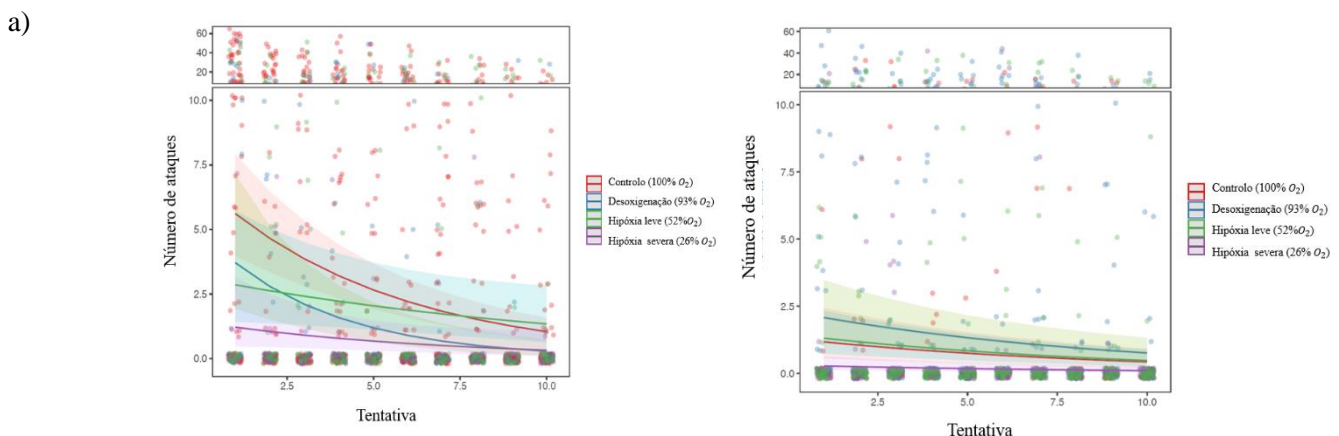


Figura 3.5: Número de ataques em função de tentativa em cada um dos tratamentos em demonstradores (a) e observadores (b). As linhas representam a média prevista do modelo, o sombreado o intervalo de confiança a 95% e os pontos os valores medidos. A vermelho está representado o controlo, a azul a desoxigenação, a verde a hipóxia leve, a roxo a hipóxia severa.

O tempo de latência ao primeiro ataque foi influenciado significativamente pelo tratamento (**Figura 3.6**, $\chi^2 = 22,7073$; d.f= 3; $p < 0.001$), mas não pela função do indivíduo, ou pela interação de ambos os fatores.

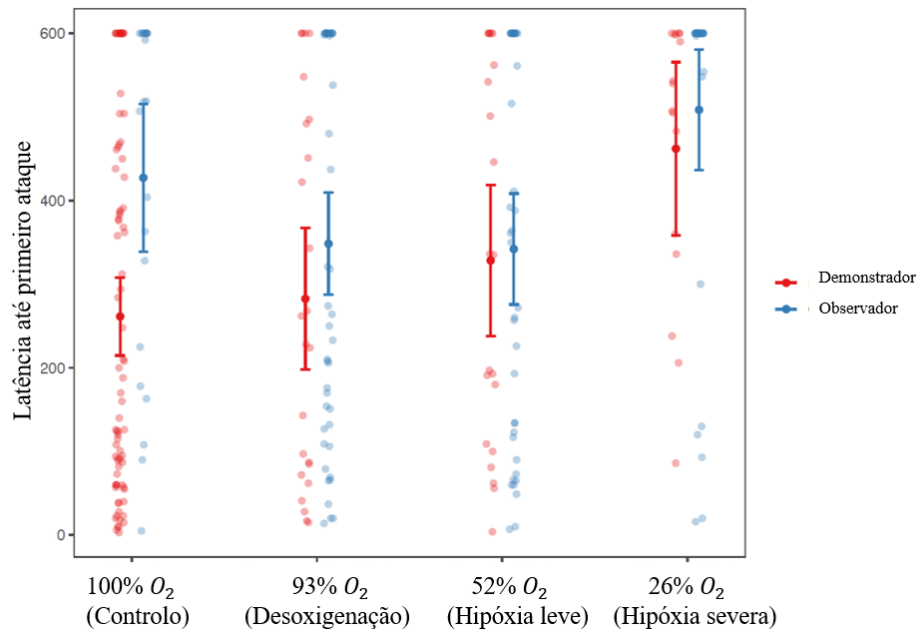


Figura 3.6: Tempo de latência ao primeiro ataque em função do tratamento (controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa) e da função do choco (demonstrador a vermelho e observador a azul). Os pontos carregados as médias previstas transformadas do modelo, e as barras representam intervalos de confiança (95%) do modelo.

3.3 Análise da camuflagem

O tempo de latência para a camuflagem do padrão disruptivo foi influenciado pelo tratamento (**Figura 3.7a** $\chi^2 = 8,2278$; d.f= 3; $p < 0.05$) revelando um aumento entre a hipóxia severa, controlo e desoxigenação. Relativamente ao tempo de latência do padrão mottle não se revelaram diferenças significativa (**Figura 3.7b** $\chi^2 = 3,587$; d.f= 3; $p = 0,3097$).

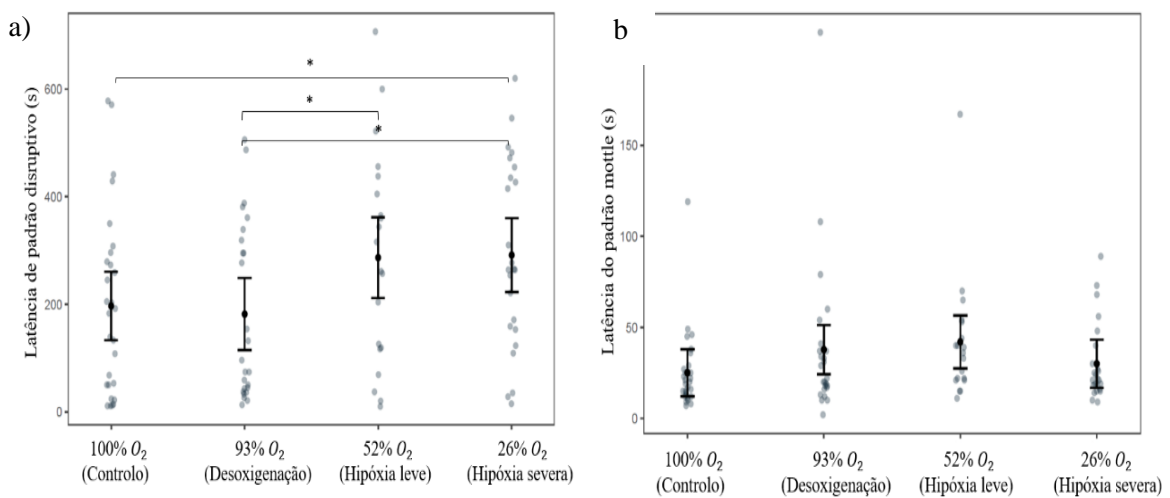


Figura 3.7: Tempo de latência verificado nos indivíduos dos tratamentos correspondentes, controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa, onde se representa o intervalo de confiança de 95% e os pontos representam os valores de cada indivíduo em segundos.

A análise de tentativa de enterro (**Figura 3.8**) ($\chi^2 = 9,3661$; d.f= 3; $p < 0.05$) revelou um aumento entre a hipóxia leve e desoxigenação.

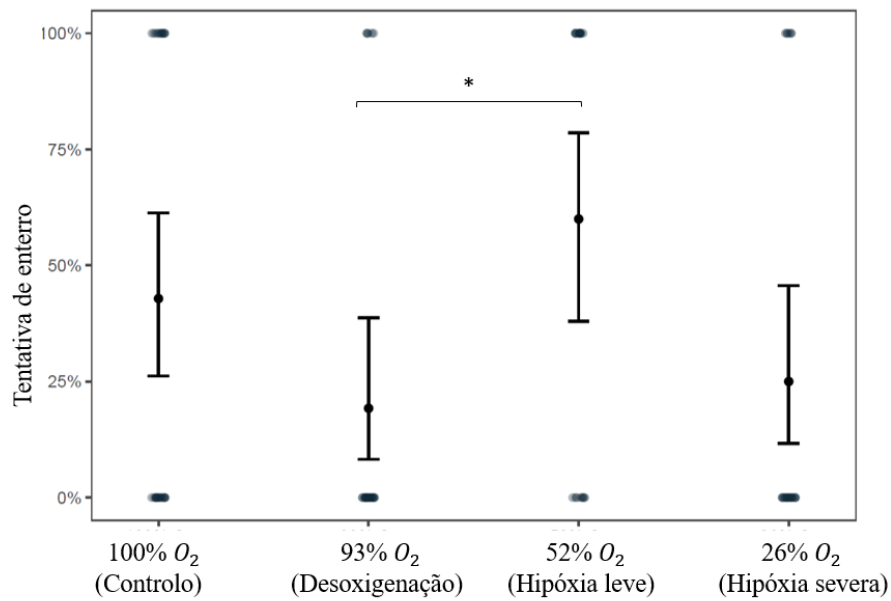


Figura 3.8: Representação da análise de tentativa de enterro, onde se representam os tratamentos analisados (controle, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa) demonstrando o intervalo de confiança de 95% para cada um, e os pontos a resposta de cada indivíduo.

Nas pontuações relativamente à camuflagem, no meio que continha areia no fundo, a pontuação do padrão mottle (**Figura 3.9a** $\chi^2 = 5,496$; d.f= 3; $p = 0,1389$) não revelou diferenças significativas, em contrário, as pontuações do meio que continha pedras, a pontuação do padrão disruptivo revelou uma diminuição entre a hipóxia severa e controlo (**Figura 3.10b** $\chi^2 = 9,0536$; d.f= 3; $p < 0,05$).

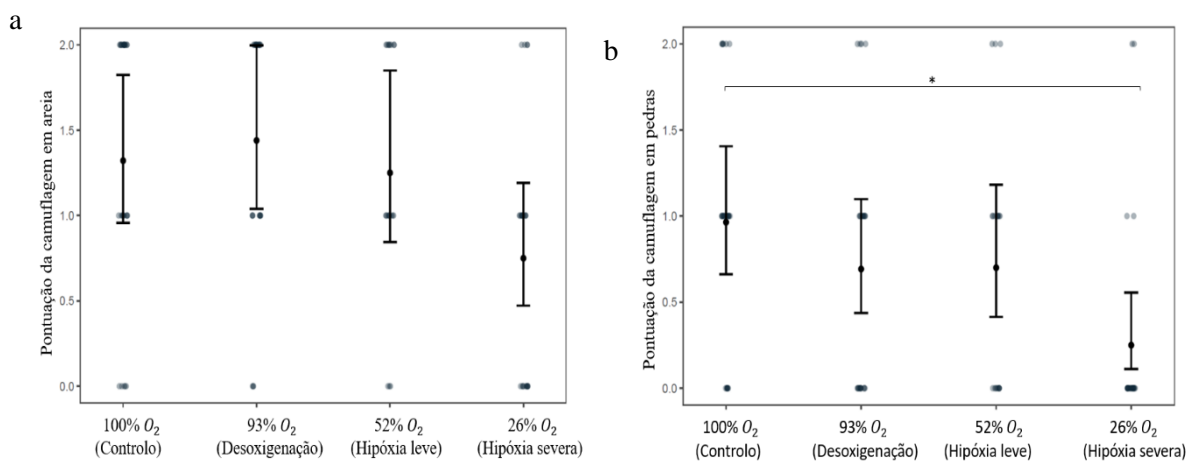


Figura 3.9: Representação das pontuações no ambiente de areia (a) e no ambiente de pedras, com a representação do intervalo de confiança de 95% e onde os pontos representam a resposta individual de cada indivíduo.

A análise da diferença na camuflagem dos indivíduos demonstrou-se significativa na diferença de pixels do manto entre hipóxia severa e controlo e desoxigenação (**Figura 3.10** $\chi^2 = 18,919$; d.f= 3; $p < 0.001$).

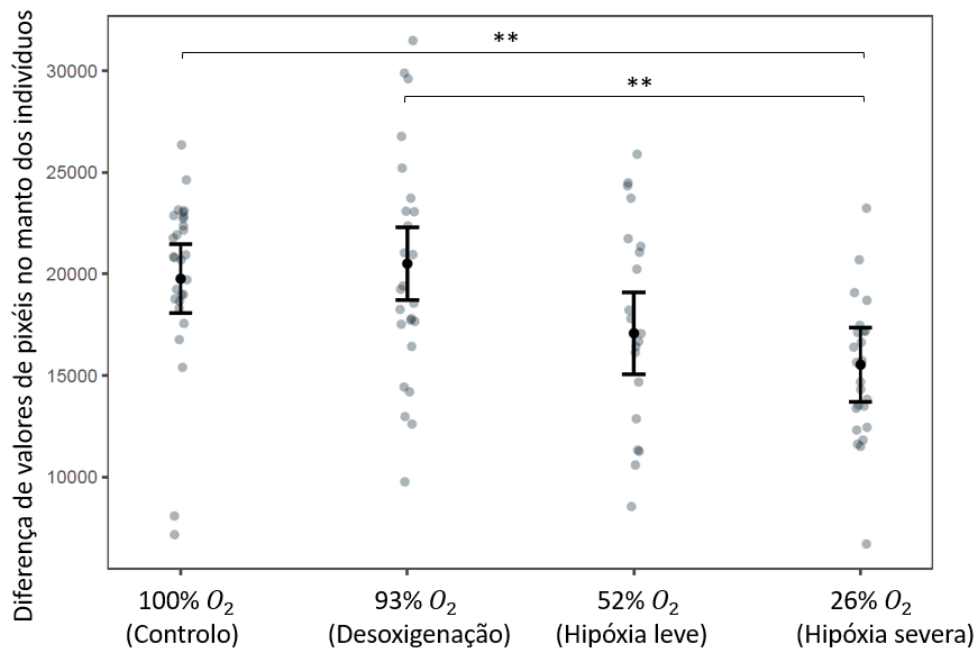


Figura 3.10: Representação da análise de diferença de pixels entre os tratamentos analisados (controlo, desoxigenação, hipóxia leve e hipóxia severa), representação do intervalo de confiança de 95% e os pontos representam a diferença verificada no manto de cada indivíduo individualmente para o padrão disruptivo.

A análise da diferença de densidade de pixels integrados (**Figura 3.11**) não revelou qualquer diferença entre tratamentos ($\chi^2 = 1,8325$; d.f= 3; $p = 0,6079$) ($\chi^2 = 6,8062$; d.f= 3; $p = 0,07834$).

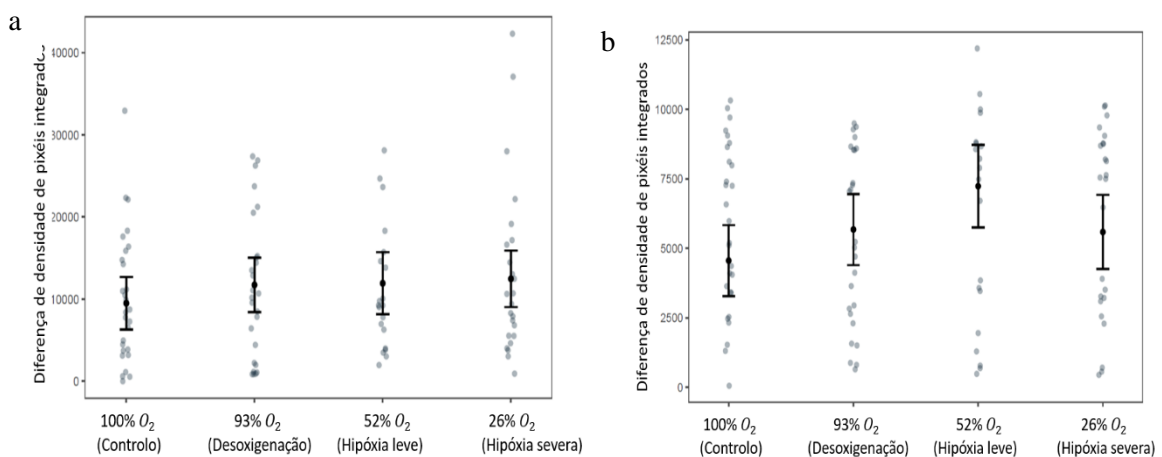


Figura 3.11: A análise de diferença de densidade de pixels integrados não demonstrou diferenças significativas, tanto na comparação do quadrado branco com as pedras brancas (a), como região escuro do indivíduo com pedras pretas (b).

3.4 Análise de biomarcadores

Recorreu-se à medição de biomarcadores (**Figura 3.12**) como TAC, SOD, CAT, GPx para verificar se as defesas antioxidantes dos chocos foram afetadas. Observou-se uma diminuição da atividade da TAC no tratamento de hipoxia severa ($\chi^2 = 31.767$; d.f= 3; $p < 0.001$), na SOD também se observa uma diminuição da sua capacidade nos indivíduos provenientes da hipoxia severa ($\chi^2 = 29.595$; d.f= 3; $p < 0.001$), assim como na GST ($\chi^2 = 16,431$; d.f= 3; $p < 0.001$). A Catalase ($\chi^2 = 2.6772$; d.f= 3; $p = 0.444$) e a GPx ($\chi^2 = 4.3813$; d.f= 3; $p = 0.223$) não revelaram qualquer diferença significativa entre tratamentos.

Relativamente ao dano oxidativo apenas foi observado um aumento significativo na LPO nos indivíduos expostos a hipoxia severa ($\chi^2 = 61.299$; d.f= 3; $p < 0.001$) e na atividade de HSP70 severa ($\chi^2 = 12.13$; d.f= 3; $p < 0.007$). O dano de DNA não apresentou diferenças significativas ($\chi^2 = 11.998$; d.f= 3; $p = 0.007$).

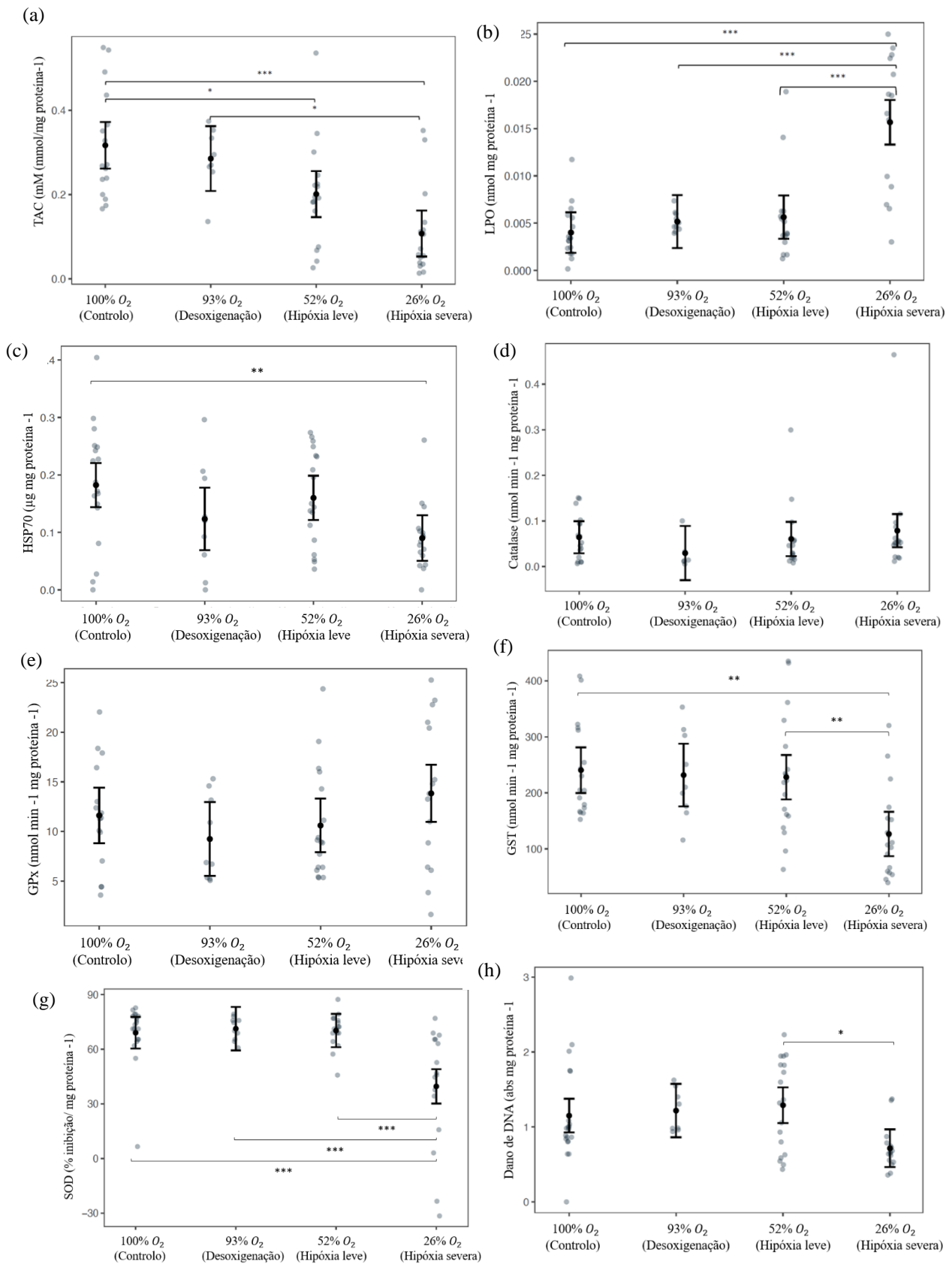


Figura 3.12: Resultados da análise dos biomarcadores analisados nesta dissertação. (a) representa o teor total de antioxidante, (b) teor de Malondialdeído, (c) proteína de choque de calor 70, (d) teor de catalase, (e) concentração de glutatona peroxidase, (f) concentração de glutatona S- transferase, (g) percentagem de superoxidase dismutase e (h) dano de DNA dos tecidos. Representa-se em todos os gráficos o intervalo de confiança de 95% e os pontos representam a resposta individual de cada organismo relativamente a cada um dos biomarcadores.

4 Discussão

Vários fatores de stress ligados às alterações globais podem causar alterações fisiológicas e comportamentais no choco (Otjacques et al., 2020; Rosa et al., 2013; Sampaio et al., 2020). Nesta dissertação demonstro pela primeira vez que a exposição de chocos a níveis reduzidos de oxigénio durante a embriogénese leva a disrupções ao nível do desenvolvimento, fisiologia e comportamento (**Tabela 4.1**). As alterações ao nível do desenvolvimento dos indivíduos e fisiologia (análise de biomarcadores) foram observadas em chocos expostos a hipóxia severa (2 mg L⁻¹) e hipóxia leve (5 mg L⁻¹) de forma aguda. Por outro lado, as alterações a níveis comportamentais foram observadas com qualquer redução de oxigénio (desoxigenação e hipóxia).

Tabela 4.1: Tabela resumo dos efeitos observados em função da redução de oxigénio em choco. São apresentadas as diferentes variáveis e respostas em função dos três tipos de exposição. NS = sem alterações significativas, ↑ = aumento significativo, ↓ = diminuição significativa.

Tipo de variável	Medidor de resposta	Desoxigenação 7 mg L ⁻¹ O ₂	Hipóxia leve 4 mg L ⁻¹ O ₂	Hipóxia severa 2 mg L ⁻¹ O ₂
Desenvolvimento	Tempo de desenvolvimento	NS	↑	↑
	Sucesso de eclosão	NS	NS	↓
	Tamanho do manto	NS	NS	↓
Dano oxidativo	LPO	NS	NS	↑
	HSP 70	NS	NS	↓
Defesas antioxidantes	TAC	NS	↓	↓
	SOD	NS	NS	↓
	GST	NS	NS	↓
	GPx	NS	NS	NS
Comportamento: Aprendizagem associal	Tentativas	NS	NS	NS
	Nº de ataques	↓	↓	↓
Comportamento: Aprendizagem social	Tentativas	↓	↓	↓
	Tempo de latência	NS	NS	↑
	Nº de ataques	↓	↓	↓
Comportamento: Camuflagem	Latência mottle	NS	NS	NS
	Latência disruptivo	NS	↑	↑
	Pontuação areia	NS	NS	NS
	Pontuação pedras	NS	NS	↓

	Diferença de pixéis	NS	NS	↓
	Tentativa de enterro	NS	↑	NS

4.1 Desenvolvimento embrionário

Neste trabalho é demonstrado a ocorrência de um prolongamento da embriogênese traduzindo-se num maior tempo de desenvolvimento em indivíduos provenientes da hipóxia severa. Do mesmo modo verificou-se uma menor taxa de eclosão e uma acentuada diminuição de tamanho dos indivíduos provenientes desse tratamento. O sucesso de eclosão, assim como o tempo de eclosão dos diversos organismos marinhos em resposta a condições de redução de O₂ no ambiente podem traduzir-se em alterações nestes dois fatores (Hassell et al., 2008).

Esta alteração foi observada em outras espécies como o alabote (*Reinhardtius hippoglossoides*), o salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) e o sargo-preto (*Acanthopagrus butcheri*) onde o sucesso de eclosão sofreu uma redução quando expostos à reduzida disponibilidade de O₂ (Del Rio et al., 2019; Hassell et al., 2008; Mejri et al., 2012). A diminuição de tamanho verificada pode ser explicada devido ao processo de desenvolvimento ser muito dispendioso energeticamente e depender na sua maioria de metabolismo aeróbico, processo limitado pela ausência de O₂, ocorrendo uma depressão metabólica de maneira a tentar economizar energia para quando as condições ótimas se verificarem se poderem desenvolver.

4.2 Respostas fisiológicas

Ao nível do dano oxidativo ocorrido pela limitação de O₂, observou-se um aumento significativo no biomarcador LPO através da análise de MDA. O mesmo resultado foi observado por Jiang et al., (2019) em *Sepia pharaonic* utilizando tecidos do fígado e cerebrais, sugerindo uma incapacidade das enzimas para a prevenção de altos níveis de ROS durante o processo de reoxigenação, causando danos nos organismos. Esta alteração demonstra sistemas de defesa antioxidante insuficientes, assim como uma necessidade de ativação do metabolismo aeróbico quando expostos a ambientes stressantes. Pelo contrário, Capaz et al., (2017) em ensaios com *Sepia officinalis* utilizando uma limitação de ~50% de O₂ não encontrou diferenças neste biomarcador entre hipóxia e controlo; e Trübenbach et al., (2013) com a espécie *Dosidicus gigas* observou um aumento na resposta de HSP, contrário ao que foi observado nesta dissertação.

Para fazer face aos danos oxidativos os indivíduos possuem defesas antioxidantes. Nestes, este estudo face às condições de redução de O₂, foi encontrada uma diminuição da atividade de TAC assim como de GST em hipóxia severa. Estes resultados podem provir devido à possível supressão metabólica que seja espectralmente ocorrer em condições de baixo O₂ como foi demonstrado por Hadj-Moussa et al., (2018), onde a lulas Humboldt apresentaram uma redução na fosforilação de histonas, supressão na tradução e diminuição na capacidade antioxidante (adaptações moleculares), assim como uma diminuição na capacidade defensiva contra a produção de ROS. Complementarmente a SOD demonstrou uma diminuição da sua atividade nos indivíduos expostos a hipóxia, que pode ser explicado pela redução de dano celular durante a fase de reoxigenação, o que também foi observado por Trübenbach et al., (2013) em *Dosidicus gigas*, confirmando a baixa capacidade antioxidante nos cefalópodes. Nesse estudo, os autores observaram uma correlação da atividade de SOD e CAT, o que não foi observado nos chocos. No estudo de Jiang et al., (2019), *Sepia pharaonic* demonstrou um

aumento na atividade da SOD que estimula o sistema de defesa antioxidante, contrariando os resultados obtidos neste estudo.

Com este estudo posso concluir que os chocos expostos à reduzida disponibilidade de O₂ demonstraram necessidade de ativar o seu metabolismo aeróbico durante a supressão metabólica sentida durante a embriogénese, o que se traduziu na diminuição das defesas antioxidantes contra ROS durante o período de reoxigenação.

4.3 Comportamento

4.3.1 Aprendizagem

Relativamente aos indivíduos provenientes do controlo, observou-se uma drástica diminuição do número de tentativas de ataque ao longo do tempo, assim como um aumento do tempo de latência, confirmando uma potencial aprendizagem, como já tinha sido descrito por Sampaio et al., (2020) quando este utilizou indivíduos apenas do controlo para estudar a aprendizagem social e associativa.

Nesta dissertação é demonstrado que a diminuição da disponibilidade de O₂ afeta o comportamento de aprendizagem dos chocos, onde os indivíduos expostos a hipóxia severa demonstram maior resistência a atacar as presas, aumentando o tempo de latência assim como uma drástica diminuição no número de ataques demonstrado por estes indivíduos comparando com os restantes tratamentos. A visão sendo um processo sensorial e metabolicamente exigente é bastante afetado principalmente quando os indivíduos durante a embriogénese são expostos a este fenómeno. O oxigénio é essencial para o funcionamento dos neurónios e fotorreceptores sendo utilizado na fosforilação oxidativa para libertar energia essencial para os sistemas visuais de alta resolução, como o dos cefalópodes (McCormick & Levin, 2017).

Os resultados encontrados podem provir de uma estratégia de sobrevivência para armazenamento de energia restringindo o seu movimento, mas também uma limitação grave ao nível da função visual devido a um deficiente desenvolvimento ocular que diminui a sensibilidade aos movimentos efetuados pela presa (Hadj-Moussa et al., 2018; McCormick & Levin, 2017). Esta limitação pode-se traduzir numa dificuldade de alimentação e de se manterem vivos em ambiente selvagem. A diminuição de O₂ pode também afetar a produção de inibidores neurotransmissores, como o ácido γ -aminobutírico (GABA) e/ou a adenosina no cérebro, que diminuem a ação neural necessária para a transmissão de sinais visuais. Esta alteração poderia explicar a dificuldade dos indivíduos expostos a hipóxia maioritariamente não realizem ataques às presas (McCormick & Levin, 2017). Alterações ao nível do sistema visual foi observado por Wang & Widdows, (1991) em mexilhão (*Mytilus edulis*) onde ocorreu a redução da mancha ocular, e por Gowland et al., (2002) em lulas (*Sepioteuthis australis*) onde foram encontradas deficiências oculares nos indivíduos.

4.3.2 Camuflagem

Na camuflagem, a latência no padrão disruptivo aumenta significativamente em indivíduos expostos aos diferentes níveis de hipóxia, o que poderia ser explicado pela dificuldade / impossibilidade de enterrar, devido à sua capacidade visual ter sido afetada pela falta de oxigénio durante o período de embriogénese, limitando o desenvolvimento do lobo ótico e dificultando a sua perceção relativamente ao ambiente envolvente (Liu et al., 2017; McCormick & Levin, 2017). Isto pode levar a uma dificuldade adicional aos indivíduos em interpretar o fundo e desenvolver o padrão corporal desejável, logo tornando-se mais suscetíveis a serem capturados pelos seus predadores (Hadj-Moussa et al., 2018).

A dificuldade dos chocos expostos à hipóxia em reproduzir um padrão disruptivo intenso nas pedras (diferenças de intensidade de pixels nos planos do corpo dos indivíduos) também se refletiu em pontuações mais baixas de camuflagem, denotando, portanto, uma dificuldade na capacidade de se combinar com o fundo. Esta limitação na camuflagem poderá ser explicada por alterações óticas e neurais ocorridas durante a embriogênese que diminuem a função visual dificultando a sua capacidade de visão para que se consigam camuflar de maneira correta. O lobo ótico tem a função de interpretação dos sinais provenientes da retina (córtex) sendo que este é suscetível de ter sido afetado, assim como a produção de inibidores neurotransmissores, como GABA ou adenosina no cérebro, que diminuem a ação neural necessária para a transmissão de sinais visuais (McCormick & Levin, 2017).

5 Considerações finais

Neste estudo foi possível compreender os efeitos da exposição a dois níveis diferentes de hipóxia (hipóxia leve e hipóxia severa) nos chocos, causando restrições comportamentais e fisiológicas. A nível comportamental, a limitação no número de ataques pode resultar numa dificuldade na captura de alimento, onde a limitação do desenvolvimento ocular devido à reduzida disponibilidade de oxigénio demonstrou que os indivíduos possuíam uma dificuldade para a percepção da existência da presa, assim como ao seu movimento, limitando de forma abrupta a sua capacidade de ataque, revelando uma elevada dificuldade à alimentação, o que demonstra que em cenários graves de limitação de O₂ os chocos poderão não se conseguir adaptar a estes fatores de stress. Outra explicação para os resultados obtidos provém do gasto energético por parte dos indivíduos que limitou esta atividade, podendo levar em casos extremos à morte. Ao nível da camuflagem, conclui-se que os indivíduos expostos à hipóxia apresentaram uma grande dificuldade de adaptação a este comportamento, o que poderia ser explicado se tiver ocorrido algum tipo de alteração nos cromatóforos (controlados pelo sistema nervoso) devido à limitação de oxigénio, assim como alterações no lobo ótico que dificulte a percepção do meio envolvente. Ao nível das respostas fisiológicas, as alterações encontradas demonstram uma dificuldade na proteção por parte dos indivíduos contra a formação de ROS quando ocorre a reoxigenação, bem como o aumento do dano celular causando a sua acumulação, além da ocorrência de uma diminuição da capacidade de defesa contra a formação de radicais livres em condições de hipóxia.

A limitada informação sobre a diminuição de oxigénio e a sua influência em diferentes tipos de organismos demonstra que este tema ainda é muito pouco estudado, revelando uma importante lacuna, sendo este um dos fatores que devido às alterações climáticas aumentará a sua frequência de ocorrência. Para futuros estudos os efeitos da hipóxia no metabolismo do choco durante a embriogênese, assim como os mecanismos neurais de indivíduos expostos a este tipo de limitação devem ser estudados.

6 Bibliografia

- Alves, D. M., Cristo, M., Sendão, J., & Borges, T. C. (2006). Diet of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Sepiidae) off the south coast of Portugal (eastern Algarve). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86(2), 429–436. <https://doi.org/10.1017/s0025315406013312>
- Barbosa, A., Mäthger, L. M., Buresch, K. C., Kelly, J., Chubb, C., Chiao, C. C., & Hanlon, R. T. (2008). Cuttlefish camouflage: The effects of substrate contrast and size in evoking uniform, mottle or disruptive body patterns. *Vision Research*, 48(10), 1242–1253. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.02.011>
- Battin, T. J., Luysaert, S., Kaplan, L. A., Aufdenkampe, A. K., Richter, A., & Tranvik, L. J. (2009a). The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience*, 2(9), 598–600. <https://doi.org/10.1038/ngeo618>
- Beers, R. F. Jr. & Si, I. W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133-40.
- Bernardello, R., Marinov, I., Palter, J. B., Sarmiento, J. L., Galbraith, E. D., & Slater, R. D. (2014). Response of the Ocean Natural Carbon Storage to Projected Twenty-First-Century Climate Change. *Journal of Climate*, 27(5), 2033–2053. <https://doi.org/10.1175/jcli-d-13-00343.1>
- Boal, J. G., Wittenberg, K. M., & Hanlon, R. T. (2000). Observational learning does not explain improvement in predation tactics by cuttlefish (Mollusca: Cephalopoda). *Behavioural Processes*, 52(2–3), 141–153. [https://doi.org/10.1016/s0376-6357\(00\)00137-6](https://doi.org/10.1016/s0376-6357(00)00137-6)
- Bogan, R. A. J., Ohde, S., Arakaki, T., Mori, I., & McLeod, C. W. (2008). Changes in Rainwater pH associated with Increasing Atmospheric Carbon Dioxide after the Industrial Revolution. *Water, Air, and Soil Pollution*, 196(1), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9774-0>
- Boycott, B. B. (1960). The functioning of the statocysts of *Octopus vulgaris*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 152, 78–87. <https://doi.org/10.1098/rspb.1960.0025>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Breitburg, D., Levin, L. A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F. P., Conley, D. J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G. S., Limburg, K. E., Montes, I., Naqvi, S. W. A., Pitcher, G. C., Rabalais, N. N., Roman, M. R., Rose, K. A., Seibel, B. A., ... Zhang, J. (2018). Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science*, 359(6371). <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>
- Capaz, J. C., Tunnah, L., MacCormack, T. J., Lamarre, S. G., Sykes, A. V., & Driedzic, W. R. (2017). Hypoxic induced decrease in oxygen consumption in cuttlefish (*Sepia officinalis*) is associated with minor increases in mantle octopine but no changes in markers of protein turnover. *Frontiers in Physiology*, 8, 344. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00344>
- Castillo, M. G., Salazar, K. A., & Joffe, N. R. (2015). The immune response of cephalopods from head to foot. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1), 145–160. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.029>
- Chiao, C. C., Chubb, C., & Hanlon, R. T. (2015). A review of visual perception mechanisms that regulate rapid adaptive camouflage in cuttlefish. *Journal of Comparative Physiology*, 201(9), 933–945. <https://doi.org/10.1007/s00359-015-0988-5>
- Darmaillacq, A. S., Chichery, R., Poirier, R., & Dickel, L. (2004). Effect of early feeding experience on subsequent prey preference by cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Developmental Psychobiology*, 45(4), 239–244. <https://doi.org/10.1002/dev.20034>

- Del Rio, A. M., Davis, B. E., Fanguie, N. A., & Todgham, A. E. (2019). Combined effects of warming and hypoxia on early life stage Chinook salmon physiology and development. *Conservation Physiology*, 7(1). <https://doi.org/10.1093/conphys/coy078>
- Dias, F. B., Fiedler, R., Marsland, S. J., Domingues, C. M., Clément, L., Rintoul, S. R., Mcdonagh, E. L., Mata, M. M., & Savita, A. (2020). Ocean Heat Storage in Response to Changing Ocean Circulation Processes. *Journal of Climate*, 33(21), 9065–9082. <https://doi.org/10.1175/jcli-d-19-1016.1>
- Diaz, R. J., & Rosenberg, R. (1995). Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and marine biology. An annual review*, 33, 245-03.
- Domingues, P. M., Bettencourt, V., & Guerra, Á. (2006). Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. *Vie et Milieu* 56(2): 109-120 (2006)
- Dorey, N., Melzner, F., Martin, S., Oberhänsli, F., Teyssié, J. L., Bustamante, P., Gattuso, J. P., & Lacoue-Labarthe, T. (2012). Ocean acidification and temperature rise: effects on calcification during early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Marine Biology*, 160(8), 2007–2022. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2059-6>
- Fago, A., & Jensen, F. B. (2015). Hypoxia tolerance, nitric oxide, and nitrite: Lessons from extreme animals. *Physiology*, 30(2), 116–126. <https://doi.org/10.1152/physiol.00051.2014>
- Farhat, E., Cheng, H., Romestaing, C., Pamenter, M., & Weber, J. M. (2021). Goldfish Response to Chronic Hypoxia: Mitochondrial Respiration, Fuel Preference and Energy Metabolism. *Metabolites*, 11(3), 187. <https://doi.org/10.3390/metabo11030187>
- Gowland, F. C., Moltshaniwskyj, N. A., & Steer, M. A. (2002). Description and quantification of developmental abnormalities in a natural *Sepioteuthis australis* spawning population (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Ecology Progress Series*, 243, 133–141. <https://doi.org/10.3354/meps243133>
- Gras, M., Safi, G., Lebretonchel, H., Quinquis, J., Foucher, É., Koueta, N., & Robin, J. P. (2016). Stock structure of the English Channel common cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) during the reproduction period. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), 167–176. <https://doi.org/10.1017/s0025315415001162>
- Hadj-Moussa, H., Logan, S. M., Seibel, B. A., & Storey, K. B. (2018). Potential role for microRNA in regulating hypoxia-induced metabolic suppression in jumbo squids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(6), 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.04.007>
- Hassell, K. L., Coutin, P. C., & Nugegoda, D. (2008). Hypoxia impairs embryo development and survival in black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Marine Pollution Bulletin*, 57(6–12), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.045>
- Heyes, C. M. (1994). Social learning in animals: categories and mechanisms. *Biological Reviews*, 69(2), 207-231.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C. D., Sale, P. F., Edwards, A. J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C. M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R. H., Dubi, A., & Hatziolos, M. E. (2007). Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318(5857), 1737–1742. <https://doi.org/10.1126/science.1152509>
- Huang, K. L., & Chiao, C. C. (2012). Can cuttlefish learn by observing others? *Animal Cognition* 2012, 16(3), 313–320. <https://doi.org/10.1007/s10071-012-0573-z>
- Hughes, D. J., Alderdice, R., Cooney, C., Köhl, M., Pernice, M., Voolstra, C. R., & Suggett, D. J.

- (2020). Coral reef survival under accelerating ocean deoxygenation. *Nature Climate Change*, 10(4), 296–307. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-0737-9>
- Jiang, M., Zhao, C., Yan, R., Li, J., Song, W., Peng, R., Han, Q., & Jiang, X. (2019). Continuous Inking Affects the Biological and Biochemical Responses of Cuttlefish *Sepia pharaonis*. *Frontiers in Physiology*, 10, 1429. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01429>
- Keeling, R. F., Körtzinger, A., & Gruber, N. (2010). Ocean deoxygenation in a warming world. *Annual Review of Marine Science*, 2(1), 199–229. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163855>
- Khatiwalla, S., Tanhua, T., Mikaloff Fletcher, S., Gerber, M., Doney, S. C., Graven, H. D., Gruber, N., McKinley, G. A., Murata, A., Ríos, A. F., & Sabine, C. L. (2013). Global ocean storage of anthropogenic carbon. *Biogeosciences*, 10(4), 2169–2191. <https://doi.org/10.5194/bg-10-2169-2013>
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S., & Cosic, V. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology*, 54(5), 356–361. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.5.356>
- Kwiatkowski, L., Torres, O., Bopp, L., Aumont, O., Chamberlain, M., R. Christian, J., P. Dunne, J., Gehlen, M., Ilyina, T., G. John, J., Lenton, A., Li, H., S. Lovenduski, N., C. Orr, J., Palmieri, J., Santana-Falcón, Y., Schwinger, J., Séférian, R., A. Stock, C., ... Ziehn, T. (2020). Twenty-first century ocean warming, acidification, deoxygenation, and upper-ocean nutrient and primary production decline from CMIP6 model projections. *Biogeosciences*, 17(13), 3439–3470. <https://doi.org/10.5194/BG-17-3439-2020>
- Lawrence, R. A., & Burk, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(4), 952–958. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(76)90747-6)
- Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., & Diao, X. (2016). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 144, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.051>
- Liu, Y. C., Liu, T. H., Su, C. H., & Chiao, C. C. (2017). Neural organization of the optic lobe changes steadily from late embryonic stage to adulthood in cuttlefish *Sepia pharaonis*. *Frontiers in Physiology*, 8, 538. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00538>
- Lopes, A. R., Sampaio, E., Santos, C., Couto, A., Pegado, M. R., Diniz, M., Munday, P. L., Rummer, J. L., & Rosa, R. (2018). Absence of cellular damage in tropical newly hatched sharks (*Chiloscyllium plagiosum*) under ocean acidification conditions. *Cell Stress and Chaperones*, 23(5), 837–846. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0892-3>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)63504-5)
- McCormick, L. R., & Levin, L. A. (2017). Physiological and ecological implications of ocean deoxygenation for vision in marine organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 375(2102). <https://doi.org/10.1098/rsta.2016.0322>
- Mejri, S., Tremblay, R., Lambert, Y., & Audet, C. (2012). Influence of different levels of dissolved oxygen on the success of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) egg hatching and embryonic development. *Marine Biology*, 159(8), 1693–1701. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-1957-y>
- Messenger, J. B. (1968). The visual attack of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Animal Behaviour*, 16(2–

- 3), 342–357. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(68\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(68)90020-1)
- Moura, É., Pimentel, M., Santos, C. P., Sampaio, E., Pegado, M. R., Lopes, V. M., & Rosa, R. (2019). Cuttlefish early development and behavior under future high CO₂ conditions. *Frontiers in Physiology, 10*, 975. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00975>
- Njemini, R., Lambert, M., Demanet, C., & Mets, T. (2005). Heat Shock Protein 32 in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Effect of Aging and Inflammation. *Journal of Clinical Immunology, 25*(5), 405–417. <https://doi.org/10.1007/s10875-005-5361-y>
- O'Brien, C. E., Mezrai, N., Darmaillacq, A. S., & Dickel, L. (2016). Behavioral development in embryonic and early juvenile cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Developmental Psychobiology, 59*(2), 145–160. <https://doi.org/10.1002/dev.21476>
- Otjacques, E., Repolho, T., Paula, J. R., Simão, S., Baptista, M., & Rosa, R. (2020). Cuttlefish buoyancy in response to food availability and ocean acidification. *Biology, 9*(7). <https://doi.org/10.3390/biology9070147>
- Parrilla-Taylor, D. P., & Zenteno-Savín, T. (2011). Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture, 318*(3–4), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.015>
- Reiter, S., Hülsdunk, P., Woo, T., Lauterbach, M. A., Eberle, J. S., Akay, L. A., Longo, A., Meier-Credo, J., Kretschmer, F., Langer, J. D., Kaschube, M., & Laurent, G. (2018). Elucidating the control and development of skin patterning in cuttlefish. *Nature 2018 562:7727, 562*(7727), 361–366. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0591-3>
- Reiter, S., & Laurent, G. (2020). Visual perception and cuttlefish camouflage. *Current Opinion in Neurobiology, 60*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.10.010>
- Richards, J. G. (2009). Chapter 10 Metabolic and Molecular Responses of Fish to Hypoxia. *Fish Physiology, 27*(C), 443–485. [https://doi.org/10.1016/s1546-5098\(08\)00010-1](https://doi.org/10.1016/s1546-5098(08)00010-1)
- Rosa, R., Trubenbach, K., Repolho, T., Pimentel, M., Faleiro, F., Boavida-Portugal, J., Baptista, M., Lopes, V. M., Dionísio, G., Leal, M. C., Calado, R., & Pörtner, H. O. (2013). Lower hypoxia thresholds of cuttlefish early life stages living in a warm acidified ocean. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences, 280*(1768). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1695>
- Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesell, U., ... & Watson, A. (2005). Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. *The Royal Society*.
- Sampaio, E., Ramos, C. S., Bernardino, B. L. M., Bleunven, M., Augustin, M. L., Moura, É., Lopes, V. M., & Rosa, R. (2020). Neurally underdeveloped cuttlefish newborns exhibit social learning. *Animal Cognition, 24*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1007/s10071-020-01411-1>
- Schickele, A., Francour, P., & Raybaud, V. (2021). European cephalopods distribution under climate-change scenarios. *Scientific Reports, 11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83457-w>
- Seibel, B. A., Häfker, N. S., Trübenbach, K., Zhang, J., Tessier, S. N., Pörtner, H. O., Rosa, R., & Storey, K. B. (2014). Metabolic suppression during protracted exposure to hypoxia in the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, living in an oxygen minimum zone. *Journal of Experimental Biology, 217*(14), 2555–2568. <https://doi.org/10.1242/jeb.100487>
- Shen, J., Deininger, P., Hunt, J. D., & 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), 574–580. <https://doi.org/10.1002/cncr.22417>
- Sigwart, J. D., Lyons, G., Fink, A., Gutowska, M. A., Murray, D., Melzner, F., Houghton, J. D. R., & Hu, M. Y. an. (2016). Elevated pCO₂ drives lower growth and yet increased calcification in the early life history of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *ICES Journal of*

- Marine Science*, 73(3), 970–980. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv188>
- Skelhorn, J., & Rowe, C. (2016). Cognition and the evolution of camouflage. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1825). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2890>
- Staddon, J., & Morcombe, P. (2020). The Case for Carbon Dioxide. *Academic Questions*, 33(2), 246–258. <https://doi.org/10.1007/s12129-020-09871-0>
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (2004). Oxygen limitation and metabolic rate depression. *Functional metabolism: regulation and adaptation*, 415–442.
- Trübenbach, K., Teixeira, T., Diniz, M., & Rosa, R. (2013). Hypoxia tolerance and antioxidant defense system of juvenile jumbo squids in oxygen minimum zones. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 95, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2012.10.001>
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
- Vitousek, P. M. (1992). Global Environmental Change: An Introduction. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23(1), 1–14. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.23.110192.000245>
- Wang, W. X., & Widdows, J. (1991). Physiological responses of mussel larvae *Mytilus edulis* to environmental hypoxia and anoxia. *70*, 223–236.
- Wells, M. J. (1958). Factors Affecting Reactions To Mysis By Newly Hatched Sepia. *Behaviour*, 13(1–2), 96–111. <https://doi.org/10.1163/156853958x00055>
- West, J. B. (2017). Physiological Effects of Chronic Hypoxia. *New England Journal of Medicine*, 376(20), 1965–1971. <https://doi.org/10.1056/nejmra1612008>
- Wu, R. S. S. (2002). Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1–12), 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0025-326x\(02\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326x(02)00061-9)
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. (2009). Mixed effects models and extensions in ecology with R. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-87458-6>
- Zylinski, S., Osorio, D., & Shohet, A. J. (2009). Cuttlefish camouflage: context-dependent body pattern use during motion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1675), 3963–3969. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1083>