

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS**  
**PÓS GRADUAÇÃO EM DINÂMICA DOS OCEANOS E DA TERRA**

**CAROLINA DIAS DA SILVA**

**RESPOSTAS *IN VITRO* DAS ANÊMONAS-DO-MAR *ANEMONIA SARGASSENSIS*  
E *DIADUMENE LINEATA* AO ESTRESSE TÉRMICO**

**NITERÓI**

**2018**

**CAROLINA DIAS DA SILVA**

**RESPOSTAS *IN VITRO* DAS ANÊMONAS-DO-MAR *ANEMONIA SARGASSENSIS*  
E *DIADUMENE LINEATA* AO ESTRESSE TÉRMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e Terra, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Dinâmica dos Oceanos e da Terra

Orientador: **Prof. Dr. Bernardo A. P. da Gama**

**NITERÓI**

**2018**

**CAROLINA DIAS DA SILVA**

**RESPOSTAS *IN VITRO* DAS ANÊMONAS-DO-MAR *ANEMONIA SARGASSENSIS*  
E *DIADUMENE LINEATA* AO ESTRESSE TÉRMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e Terra, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Dinâmica dos Oceanos e da Terra

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Bernardo A.P. da Gama – UFF**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cinthya Simone Gomes Santos– UFF**

---

**Prof. Dr. Erwan Plouguerné – JBRJ**

---

**Prof. Dr. Fábio Bettini Pitombo– UFF (Suplente)**

**Niterói**

**2018**

Ficha catalográfica automática - SDC/BIG

D541r Dias da Silva, Carolina  
RESPOSTAS IN VITRO DAS ANÊMONAS-DO-MAR ANEMONIA SARGASSENSIS  
E DIADUMENE LINEATA AO ESTRESSE TÉRMICO / Carolina Dias da  
Silva ; Bernardo Antonio Perez da Gama, orientador. Niterói,  
2018.

81 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,  
Niterói, 2018.

1. Mudanças climáticas. 2. Estresse térmico. 3.  
anêmonas-do-mar. 4. Tolerância térmica. 5. Produção  
intelectual. I. Título II. Antonio Perez da Gama, Bernardo,  
orientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de  
Geociências.

CDD -

Bibliotecária responsável: Lígia Polycarpo Martins Medeiros - CRB7/3116

Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que Ele me concedeu até hoje. Por me fazer perseverante para conquistar meus objetivos e renovar minha fé a cada dia, no momento que fosse. À minha grande família, que se fez muito presente em todos os acontecimentos da minha vida, obrigada por me doarem o amor de vocês, os conselhos, cuidados, sorrisos, e pela confiança depositada. À minha mãe e ao meu pai, que foram e são meu abrigo seguro, de onde recebi e recebo apoio incondicional. Eles que sempre acreditaram em mim e batalharam muito para me proporcionar o melhor que pudessem. Agradeço por sempre me incentivarem nas minhas escolhas e tornarem possível tudo isso. Daniel, meu amor, muito obrigada! Você me acompanha e foi um dos meus maiores incentivadores.

Além dos ensinamentos, essa universidade me deu os melhores presentes da vida, meus amigos bioúfficos! Um agradecimento especial a vocês. Mari, obrigada pela irmandade, por ser essa amiga na alegria e na tristeza, ouvir minhas lamentações, por seus conselhos e ajuda em todos os momentos que eu precisei. Suelton (ou Ewerton) também, obrigada pelo apoio e por dividir comigo certos momentos hilários. Durante esses anos de faculdade vocês foram minha segunda família, dividindo sonhos, sorrisos e lágrimas. Obrigada por marcarem essa estrada com tanta coisa boa.

Agradeço ao projeto *GAME* que tornou possível este trabalho e nos ajudou a estruturar e organizar nosso laboratório. Assim como à Anna Dewert meu par binacional com quem realizei todos os experimentos e tornou-se uma grande amiga. Muito obrigada aos alunos de iniciação à pesquisa que contribuíram muito no laboratório pra realização deste estudo, Débora, Luiz Felipe, Camilo, Anne, Alexia. Minha gratidão ao meu orientador Prof. Dr. Bernardo A.P. da Gama, pela confiança em aceitar a embarcar nessa comigo. Obrigada pelos ensinamentos e experiência compartilhados, sempre com muita humildade e paciência, além do seu bom humor tornando mais “leve” essa trajetória. Agradeço também a professora Dra. Débora Pires por doar seu tempo e conhecimento ao identificar uma das espécies de nosso trabalho.

## RESUMO

Durante as últimas décadas, o aumento da temperatura global foi o mais rápido na história registrada. Sabe-se que mudanças no clima estão ocorrendo, seja por causas naturais ou antropogênicas, e isto está afetando os oceanos assim como os organismos. O relatório mais recente do IPCC prevê um aumento médio da temperatura da superfície dos oceanos de 4°C em uma escala global até 2100, mas espera-se que o aquecimento seja menor na área investigada. No estado do Rio de Janeiro, o aumento previsto da temperatura superficial do oceano é de 2°C até 2100. Os animais com menor habilidade de aclimação e uma menor motilidade correm maior risco diante das mudanças do clima. Este estudo investigou o limite superior de tolerância térmica e algumas respostas fisiológicas e comportamentais diante do estresse térmico da anêmona-do-mar nativa *Anemonia sargassensis* e da espécie exótica *Diadumene lineata*. Essa tolerância foi investigada aclimatando os animais a diferentes níveis de temperatura. Das variáveis de respostas analisadas foram constatadas mudanças notáveis em relação à sobrevivência, biomassa e respiração sob temperaturas mais altas. O limite de tolerância térmica superior foi dado pela temperatura em que mais de metade dos indivíduos sobreviveram. Os níveis de temperatura investigados de *A. sargassensis* foram 22°C, 30°C, 32°C e 34°C, enquanto os níveis de temperatura de *D. lineata* foram 22°C, 24°C, 26°C e 28°C. O limite de tolerância térmica superior foi de 30°C para *A. sargassensis* e de 26°C para *D. lineata*. Diversos fatores podem influenciar o limite superior de tolerância térmica das anêmonas-do-mar, como a velocidade do aquecimento, ondas de calor, aclimação e capacidade de adaptação. É notório que os organismos marinhos são vulneráveis aos impactos das mudanças climáticas. Portanto, um monitoramento dos indicadores de estresse térmico encontrados é muito importante para avaliar o estado de saúde desses animais.

**Palavras-chave:** Mudanças climáticas; estresse térmico; anêmonas-do-mar; tolerância térmica;

## ABSTRACT

During the past five decades the increase in global temperature was the fastest in recorded history. Climate change is proceeding whether due to natural or anthropogenic causes it is affecting the oceans as well as organisms. The most recent IPCC report is predicting an average surface temperature increase of the oceans of 4°C on a global scale by 2100. In the state of Rio de Janeiro the predicted increase in ocean surface temperature is 2°C by 2100. Animals with a lower ability of acclimation and a reduced motility are at higher risk of extinction due to the climate change. This study investigated the upper thermal tolerance limit and some physiological and behavioral responses in the face of thermal stress of one native sea anemones species *Anemonia sargassensis* and one exotic sea anemone species *Diadumene lineata*. The observed response variables showed remarkable changes in survival, biomass and respiration under higher temperatures. The upper thermal tolerance was investigated by acclimatizing animals to different temperature levels. The upper thermal tolerance limit was given by the temperature in which more than half of the individuals survived. The investigated temperature levels of *A. sargassensis* were 22°C, 30°C, 32°C and 34°C, whereas the temperature levels of *D. lineata* were 22°C, 24°C, 26°C and 28°C. The upper thermal tolerance limit was 30°C for *A. sargassensis* and 26°C for *D. lineata*. Several factors can influence the upper thermal tolerance limit of sea anemones, such as heating speed, heat waves, acclimatization and adaptability. It is notorious that marine ecosystems are vulnerable to the impacts of climate change. Therefore, a monitoring of the found heat stress indicators is very important in assessing the state of health of sea anemones.

**Keywords:** Climate changes; thermal stress; sea anemones; thermal tolerance;



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>A. sargassensis</i> com diâmetro do disco pedal de aproximadamente 2 cm (esquerda) e <i>D. lineata</i> com aproximadamente 0,6 cm (direita). ....	24
Figura 2 - Áreas de coleta marcadas em x: Praia de Itaipu (Niterói) e Praia dos Ossos (Armação de Búzios).....	28
Figura 3 - Compartimentos utilizados após a coleta para o transporte até o laboratório. ....	28
Figura 4 - Tanque visto de cima (esquerda); unidades experimentais dentro do tanque (direita) .....	30
Figura 5 - Esquema do desenho experimental: Tanque com água isolado por isopor (1), forrado por lona (2), pedra de aeração para cada unidade experimental (3), aquecedor (4), bomba submersa (5) para manter a temperatura homogênea e <i>data logger</i> (6).....	31
Figura 6 - Registros das temperaturas nos tanques de água dos respectivos tratamentos durante o experimento principal. <i>A. sargassensis</i> é representado nos grupos 22°C, 30°C, 32°C e 34°C. <i>D. lineata</i> é representado nos grupos 22°C, 24°C, 26°C e 28°C. As linhas pontilhadas verticais representam as seis semanas.....	31
Figura 7 - Aquecimento progressivo dos tanques de água até que cada tratamento atingisse às suas respectivas temperaturas.....	32
Figura 8 - Tanques com diferentes regimes de temperatura durante o experimento principal. ....	34
Figura 9 - <i>A. sargassensis</i> viva (a) e morta (b); <i>D. lineata</i> viva (c) e morta (d). 35	
Figura 10 - Estágios morfológicos do <i>habitus</i> (Podbielski <i>et al.</i> , 2016) .....	37
Figura 11 - <i>D. lineata</i> durante o evento de fissão (a = vista de cima, b = disco basal visto de baixo, através da unidade experimental). ....	38
Figura 12 - Sobrevivência de <i>D. lineata</i> nos diferentes regimes de temperatura durante o experimento principal. nf = Número de indivíduos ao final do experimento.....	42
Figura 13 - Sobrevivência de <i>A. sargassensis</i> nos diferentes regimes de temperatura durante o experimento principal. nf = Número de indivíduos ao final do experimento .....	42

Figura 14 - Correlação entre a biomassa úmida e a biomassa seca de <i>D. lineata</i> no final do experimento.....	43
Figura 15 - Correlação entre a biomassa úmida e a biomassa seca de <i>A. sargassensis</i> no final do experimento. ....	43
Figura 16 - Comparação da mudança de biomassa úmida (final-inicial) de <i>D. lineata</i> (esquerda) e <i>A. sargassensis</i> (direita) para os diferentes níveis de temperatura. ....	45
Figura 17 - Taxa respiratória de <i>A. sargassensis</i> nos diferentes dias (0, 21 e 42) nos tratamentos de 22°C (n=15) e 30°C (n=14) .....	47
Figura 18 - Motilidade de <i>D. lineata</i> (em cima) e <i>A. sargassensis</i> (em baixo) após 24 horas de observação no dia 0, dia 21 e dia 42 para os diferentes níveis de temperatura. ....	48
Figura 19 - Tempos de reexpansão <i>A. sargassensis</i> .....	49
Figura 20- Tempos de reexpansão <i>D. lineata</i> .....	49
Figura 21 – <i>Habitus</i> de <i>A. sargassensis</i> nos diferentes grupos de temperatura .....	52
Figura 22 - <i>Habitus</i> de <i>D. lineata</i> nos diferentes grupos de temperatura .....	52
Figura 23 - Temperaturas adicionais suportadas pelos indivíduos de <i>D. lineata</i> .....	54
Figura 24 - Proporção de peixes e espécies de invertebrados com previsão de exceder seus atuais limites superiores de tolerância térmica em 2025 (a) e 2115 (c). Modificado de Stuart-smith <i>et al.</i> (2015).....	19
Figura 25 - Esquema simplificado das numerosas interações entre espécies, o ecossistema e os efeitos climáticos (embora não descritos, também ocorrem interações entre todos os componentes do ecossistema). Modificado de Seney <i>et al.</i> (2013). ....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Visão geral de todas as variáveis de resposta e a frequência com que foram verificadas .....	34
Tabela 2 - Número de indivíduos sobreviventes nos regimes de temperatura durante o estudo piloto.....	41
Tabela 3 - Resultados estatísticos da taxa de sobrevivência entre os grupos de tratamentos de <i>D.lineata</i> via Log rank.....	42
Tabela 4 - Resultados estatísticos da taxa de sobrevivência entre os grupos de tratamentos de <i>A. sargassensis</i> via Log rank.....	42
Tabela 5 - ANOVA unifatorial das diferenças de biomassa úmida entre os tratamentos de <i>D. lineata</i> .....	44
Tabela 6 - ANOVA unifatorial das diferenças de biomassa úmida entre os tratamentos de <i>A. sargassensis</i> . .....	45
Tabela 7- <i>Repeated Measures</i> ANOVA das taxas respiratórias de <i>A. sargassensis</i> entre os tratamentos de temperatura e os dias. .....	47
Tabela 8 - <i>Repeated Measures</i> ANOVA dos tempos de reexpansão de <i>A. sargassensis</i> .....	50
Tabela 9 - <i>Repeated Measures</i> ANOVA dos tempos de reexpansão de <i>D. lineata</i> .....	50
Tabela 10 - Reação de refixação de <i>A. sargassensis</i> e <i>D. lineata</i> nos dias 0, 21 e 42 testada estatisticamente quanto às diferenças via regressão de Cox.....	51
Tabela 11- Teste <i>t</i> com correção de Welch do experimento de estresse térmico agudo .....	54

# SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Mudanças climáticas e ectotérmicos marinhos.....	14
1.2. Relevância do estudo .....	18
1.3. Anêmonas-do-mar .....	20
1.3.1. <i>Anemonia sargassensis</i> .....	22
1.3.2. <i>Diadumene lineata</i> .....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. HIPÓTESES .....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Global approach by modular experiments (GAME) .....	27
4.2. Coleta .....	27
4.3. Manutenção e aclimação dos indivíduos .....	29
4.4. Modelo experimental .....	30
4.5. Variáveis de resposta .....	34
4.5.1. Sobrevivência.....	34
4.5.2. Biomassa.....	35
4.5.3. Respiração .....	35
4.5.4. Fixação.....	36
4.5.5. Refixação .....	36
4.5.6. Motilidade .....	36
4.5.7. <i>Habitus</i> .....	37
4.5.8. Reexpansão .....	37
4.5.9. Reprodução assexuada.....	38

4.5.10.	Estresse térmico agudo.....	38
4.6.	Análises estatísticas .....	39
5.	RESULTADOS.....	41
5.1.	Sobrevivência .....	41
5.2.	Biomassa .....	43
5.3.	Fixação .....	45
5.4.	Respiração.....	46
5.5.	Motilidade .....	47
5.6.	Reexpansão.....	48
5.7.	Refixação.....	51
5.8.	<i>Habitus</i> .....	51
5.9.	Reprodução assexuada.....	53
5.10.	Estresse térmico agudo.....	53
6.	DISCUSSÃO.....	55
6.1.	Limite superior de tolerância térmica .....	55
6.2.	Biomassa .....	60
6.3.	Fixação e refixação.....	62
6.4.	Respiração.....	62
6.5.	Motilidade .....	63
6.6.	Reexpansão.....	63
6.7.	<i>Habitus</i> .....	64
6.8.	Reprodução assexuada.....	64
6.9.	Estresse térmico agudo .....	65
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
	REFERÊNCIAS .....	68

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Mudanças climáticas e ectotérmicos marinhos

Muitos estudos evidenciam que o clima está mudando, tanto por causas naturais como por atividades antropogênicas (Waters *et al.*, 2016). A temperatura média global de 1880 a 2012 aumentou 0,85°C. O consenso entre os modelos climáticos é que a temperatura vai aumentar constantemente no decorrer das décadas levando a maiores médias anuais assim como haverá aumento nas flutuações sazonais. Esses aumentos poderão variar de acordo com a localização, em alguns locais serão maiores e em outros menores do que o previsto. A temperatura das águas superficiais do oceano aumentou entre 0,09 e 0,13°C por década no período de 1971 a 2010. Tais médias globais referentes a superfície do mar são projetadas para aquecer os 100 m superiores em cerca de 0,6-2,0°C até o final do século XXI (IPCC - Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas, 2014).

No estudo de Marengo (2009), foram fornecidas futuras projeções climáticas para 2030 no Brasil, baseadas nas projeções regionais desenvolvidas pelo INPE (Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - CPTEC). Foi destacado um aumento na frequência de eventos climáticos extremos no país, como secas, enchentes, ondas de calor e de frio, furacões e tempestades (Marengo, 2009, Dereczynski *et al.*, 2013). Outros autores encontraram tendências de aquecimento significativas nas ecorregiões marinhas do Brasil durante as últimas décadas, que corroboram com as previsões climáticas globais e regionais (Beaumont *et al.*, 2011, Bernardino *et al.*, 2015). Silva e Hass (2016) estimaram os impactos do aquecimento oceânico global em projeções para o século XXI, focado na América do Sul, revelando maiores temperaturas na região norte principalmente na Amazônia, podendo alcançar aumentos maiores do que 4°C.

Em uma variedade de escalas espaciais, espécies marinhas em todo o mundo já estão experimentando os efeitos das mudanças climáticas globais devido ao aumento das temperaturas, padrões climáticos alterados, mudanças

no nível do mar, padrões de circulação, cargas de nutrientes e a acidez dos oceanos (Walther *et al.*, 2002, Stock *et al.*, 2011). Algumas espécies podem responder às mudanças climáticas, deslocando suas distribuições para regiões com condições mais favoráveis ou com mudanças na produtividade em resposta às novas condições em uma determinada região. Mudanças na distribuição de espécies já estão ocorrendo tanto nos ecossistemas terrestres (Parmesan, 2006) quanto nos marinhos (Poloczanska *et al.*, 2016), com populações migrando latitudinalmente.

Há um consenso entre os pesquisadores de que as mudanças climáticas afetarão de diferentes formas os táxons marinhos. Dentro desse contexto, muitos autores utilizam os termos “vencedores” e “perdedores” (Glantz, 1995) com a ideia de que a abundância e distribuição de algumas espécies podem permanecer estáveis ou expandir com as mudanças no clima, enquanto outras podem diminuir em abundância e distribuição (Hare *et al.*, 2016). Os vencedores são geralmente referidos em termos de efeitos positivos e benéficos, enquanto os perdedores são referidos em termos de efeitos negativos e aumento da vulnerabilidade (Somero, 2010, Brown e Thatje, 2015, Cavole *et al.*, 2016).

Estudos têm revelado várias consequências diante do aumento da temperatura dos oceanos, dentre elas, eventos de mortalidade em massa (Coma *et al.*, 2009), aumento de sensibilidade aos patógenos (Harvell *et al.*, 2002), alterações na performance de crescimento e reprodução (Pörtner e Knust, 2007, Wang e Overgaard, 2007, Wang *et al.*, 2013), mudanças na faixa de distribuição geográfica (Harley *et al.*, 2006, Doney *et al.*, 2012), invasões de espécies (Stachowicz *et al.*, 2002) e mudanças fenológicas (Edwards e Richardson, 2004). Hofmann e Todgham (2010) afirmam que em uma perspectiva abrangente, existem 3 respostas para os organismos que lidam com as mudanças climáticas. Uma delas seria a dispersão das espécies para habitats com condições mais favoráveis, outra seria a plasticidade fenotípica e fisiológica que poderiam permitir às espécies tolerarem as novas condições, ou

elas poderiam adaptar-se às novas condições por meio de mudanças genéticas pelo processo de evolução.

Nos últimos anos, tem sido revelada a importância dos impactos do aquecimento entre os ectotérmicos marinhos. Esses organismos devem adaptar-se não apenas às temperaturas médias elevadas, mas também aos eventos extremos de temperaturas, como ondas de calor, que são esperados em maior frequência, maior intensidade e em intervalos mais curtos, resultando em eventos de seleção em curto prazo (Culumber e Monks, 2014). A temperatura é uma variável ambiental predominante que determina comportamento, fisiologia, e reprodução da maioria dos organismos (Hochachka e Somero, 2002, Pörtner, 2002, Parmesan, 2006). Esta influencia diretamente a maior parte dos processos bioquímicos e exerce um forte impacto na sobrevivência e distribuição de espécies, particularmente nos organismos ectotérmicos, pois seu desenvolvimento, comportamento e fisiologia estão diretamente associados à temperatura (Nguyen *et al.*, 2011, Somero, 2012). Deste modo, a variação térmica aparece como uma importante força seletiva nesses organismos (Jentsch *et al.*, 2007, Nguyen *et al.*, 2011, Bannerman *et al.*, 2011, Bozinovic *et al.*, 2011, Thompson *et al.*, 2013). Nesse contexto, o estudo do impacto da variabilidade térmica na performance dessas espécies é importante para entender as respostas das mesmas em diferentes cenários climáticos (Stillman, 2003, Somero, 2011, Bozinovic e Pörtner, 2015, Vasquez *et al.*, 2015).

Animais ectotérmicos provenientes tanto dos trópicos quanto de áreas temperadas têm mostrado serem sensíveis às mudanças de temperatura (Compton *et al.*, 2007, Deutsch *et al.*, 2008, Tewksbury *et al.*, 2008, Morley *et al.*, 2009). No entanto, a intensidade e a habilidade dos organismos em resistir a essas mudanças são geograficamente diferenciadas (Barnes *et al.*, 2010). A hipótese de variabilidade climática (Stevens, 1989) prevê que espécies que vivem em ambientes mais estáveis termicamente terão reduzida flexibilidade fisiológica para lidar com flutuações de temperatura. A maior magnitude de variação de temperatura em latitudes temperadas é esperada para selecionar



amplitudes maiores de tolerância em animais ectotérmicos enquanto a menor variação de temperatura em latitudes tropicais é esperada para levar a amplitudes menores de tolerância (Stevens, 1989). As flutuações anuais de temperatura são geralmente pequenas nos trópicos (Mc Gregor e Nieuwolt, 1998), uma variação de apenas alguns graus representa, portanto, uma mudança proporcionalmente grande para os organismos adaptados a um ambiente relativamente estável (Donelson *et al.*, 2011).

O estudo aqui apresentado visa melhorar a compreensão da vulnerabilidade de anêmonas marinhas sob o estresse térmico. Com esta finalidade foi determinado o limite superior de tolerância térmica de dois animais ectotérmicos que vivem em um clima tropical. O ecossistema em questão, pertence à faixa equatorial, conhecida por condições ambientais bastante estáveis e de acordo com muitos autores, os organismos dessa área possuem uma alta sensibilidade às pequenas mudanças de temperatura (Stevens, 1989, Compton *et al.*, 2007; Deutsch *et al.*, 2008; Tewksbury *et al.*, 2008).

Os fenômenos de nível molecular também são importantes na manutenção do ótimo térmico e limites tolerados pelas espécies. Proteínas são componentes altamente sensíveis à temperatura e padrões de variação adaptativa têm sido descobertos nas propriedades estruturais e funcionais de proteínas de espécies adaptadas a diferentes temperaturas (Somero, 2004). Uma vez que as temperaturas ambientais começam a aproximar-se dos limites térmicos dos organismos, a sobrevivência deles vai depender da capacidade de efetivamente manter ou restaurar a integridade do conjunto de proteínas após a perturbação térmica. Uma defesa celular bem caracterizada é o mecanismo de resposta ao choque térmico, que envolve a indução de um grupo de chaperonas moleculares, conhecidas como proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock protein*), que são críticas na defesa da homeostase das proteínas, reconstrução daquelas desnaturadas, e a desagregação e substituição de proteínas que não são reparáveis (Tomanek, 2008). É comum que o estresse térmico cause uma suprarregulação na síntese

de proteínas de choque térmico. De forma mais geral, espécies que possuem falta dessas proteínas terão habilidade reduzida para diminuir os danos causados por elevadas temperaturas, pois haverá perturbações de processos regulatórios celulares importantes, vias intrínsecas e extrínsecas em que proteínas de choque térmico são de crítica significância regulatória (Creagh *et al.*, 2000, Beere, 2004).

## **1.2. Relevância do estudo**

Bernardino *et al.* (2015) analisaram ecorregiões marinhas sob uma tendência de aquecimento e constataram que a região sudeste do Brasil seria uma área transicional, onde as mudanças nas condições climáticas deverão ser elevadas. Assumindo as consequências da variabilidade biológica em resposta às tendências climatológicas passadas que foram observadas ao longo dessas ecorregiões e considerando os cenários climáticos previstos, tais tendências têm o potencial de afetar diretamente o metabolismo e conseqüentemente alterar o comportamento, a reprodução e a produtividade dos animais, resultando em mudanças de biodiversidade (Doney *et al.*, 2012, Semeniuk, 2013, Bernardino *et al.*, 2015).

O clima no estado do Rio de Janeiro é relativamente estável. A temperatura média anual do mar é de cerca de 23,6°C, atinge cerca de 26°C no verão (fevereiro e março) e 22°C no inverno (julho, agosto, setembro e outubro). Isto sem mencionar o fenômeno de ressurgência costeira de Cabo Frio, bastante comum durante o verão austral, com a entrada de águas mais frias de 13 – 15°C na Baía de Guanabara (Soares-Gomes *et al.*, 2016). As flutuações sazonais médias da temperatura da superfície do oceano são de 4°C (fonte: <http://www.inmet.gov.br>). No entanto, de acordo com as projeções de modelo regional, as anomalias médias anuais da temperatura do ar podem atingir entre 2°C a 4°C acima dos valores atuais (Marengo, 2008, Zurbenko e Luo, 2012).

Há previsões de que o aquecimento deve ser mais crítico em altas latitudes, em relação ao Oceano Austral e partes do Oceano Atlântico Norte

(IPCC, 2014). A área do Rio de Janeiro, a qual é banhada pelo oceano Atlântico, mesmo não sendo destacada como uma região crítica diante dessas previsões, poderia apresentar alterações em sua biodiversidade marinha em função do aumento de temperatura local (Stuart-Smith *et al.*, 2015). Neste estudo, os autores investigaram a vulnerabilidade das comunidades marinhas de peixes e de espécies invertebradas diante do aumento de temperatura. Para indicar os padrões de vulnerabilidade foi calculada a proporção de espécies que ultrapassariam seu limite superior de tolerância térmica até 2115 (Figura 24). A região sudeste foi indicada como umas das regiões em que os limites máximos de temperaturas das espécies seriam ultrapassados, o que poderia levar a uma provável extinção local e conseqüentemente perda de biodiversidade. Vale destacar que o estudo realizou uma previsão a longo prazo do que ocorreria com esses organismos e que os autores basearam-se em valores estimados para os aumentos de temperaturas esperados nessas regiões. Logo, tais previsões devem ser analisadas com cautela, considerando os diversos fatores que podem influenciar nesses cenários de mudanças climáticas globais.

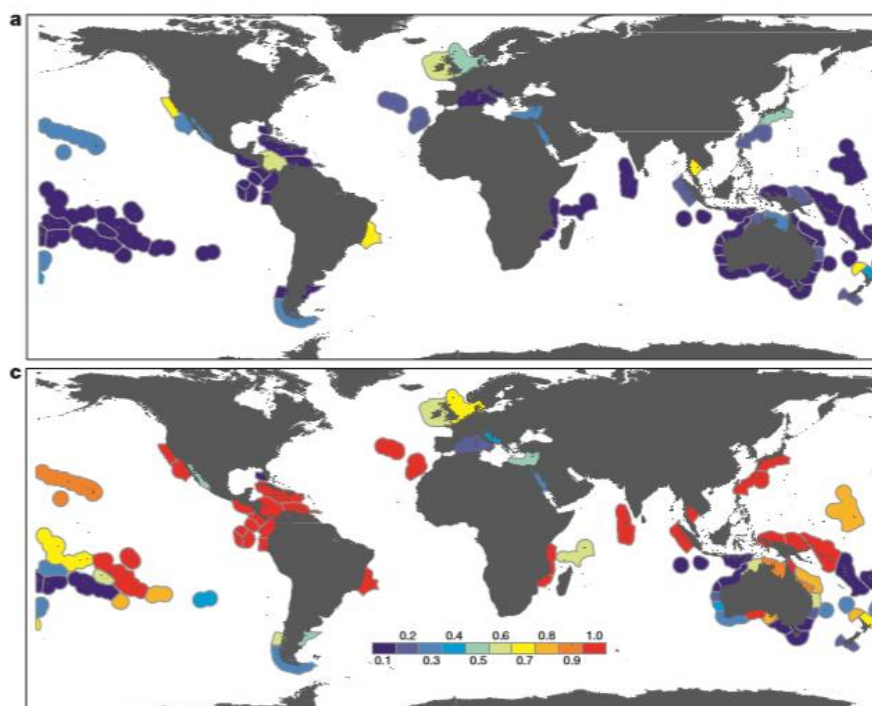


Figura 1 - Proporção de peixes e espécies de invertebrados com previsão de exceder seus atuais limites superiores de tolerância térmica em 2025 (a) e 2115 (c). Modificado de Stuart-smith *et al.* (2015).

Diversos estudos experimentais têm avaliado os limites térmicos de organismos marinhos, evidenciando que algumas espécies apresentam-se mais sensíveis ao aumento das temperaturas do que outras (Stillman, 2003, Peck *et al.*, 2014). O estudo de Stillman (2003) investigou a habilidade de caranguejos marinhos para ajustar sua amplitude térmica em resposta a diferentes níveis de temperaturas. Segundo o autor, duas considerações importantes na avaliação de como as mudanças climáticas afetarão os organismos seriam: quão próximos os organismos estão dos seus limites térmicos na natureza e uma compreensão de como os organismos respondem ao aumento da temperatura em seus habitats, especialmente o grau em que os organismos são capazes de ajustar, ou se aclimatar, a sua sensibilidade térmica. Outros estudos observaram impactos substanciais na estrutura da comunidade em recifes de corais durante períodos de temperatura do mar mais quente que o normal. Perto de seus limites térmicos superiores, os recifes de corais passaram por eventos de branqueamento em massa sempre que as temperaturas do mar excederam as médias de verão a longo prazo em mais de 1°C por várias semanas (Glynn, 1991, Hoegh-Guldberg, 1999).

As respostas de uma espécie particular à temperatura ambiental são multifacetadas. A temperatura ótima, sua sensibilidade à temperatura, processos fisiológicos, e interações ambientais (competidores ou estresses antropogênicos), contribuem para a resposta geral do organismo (Hoffmann e Sgro, 2011). Deve-se considerar que outras vias imprevisíveis podem combinar-se a tais fatores para determinar a resposta do organismo à temperatura, e como a interação dessas variáveis pode diferir entre as populações. Estudos que aferem variáveis de resposta, como temperatura máxima letal, taxa de crescimento, performance fisiológica, dentre outras, são particularmente informativos (Reitzel *et al.*, 2013).

### **1.3. Anêmonas-do-mar**

O filo Cnidaria é representado por organismos cuja característica principal é a presença de células urticantes conhecidas como cnidócitos e está dividido em cinco classes: Hydrozoa apresentando a forma polipóide e medusóide;

Cubozoa e Scyphozoa com a forma medusóide predominante; Staurozoa com medusas sésseis e Anthozoa com apenas a forma polipóide (Brusca e Brusca, 2007, Marques e Collins, 2004).

As anêmonas pertencem à subclasse Hexacorallia com tentáculos e mesentérios múltiplos de seis e à ordem Actiniaria (Daly *et al.*, 2003). O plano geral dos actiniários é relativamente bem simples: coluna cilíndrica saindo de um disco basal, coroa de tentáculos ocos circundando um disco oral na outra extremidade; a cavidade gastrovascular é dividida por mesentérios radiais e tendem a mostrar simetria bilateral; as gônadas são endodérmicas situadas nos mesentérios (Stephenson, 1928). A água contida na cavidade gastrovascular forma um esqueleto hidrostático de suporte e desempenha as funções de circulação e excreção (Zamponi e Deserti, 2009). A reprodução das anêmonas pode ser sexuada e assexuada (Sherman *et al.*, 2007). A reprodução assexuada é mais frequente em ambientes perturbados que necessitam de um rápido repovoamento a um baixo custo de energia (Ayre, 1984), como consequência, a população apresenta-se como mesmo genótipo (Shick *et al.*, 1979) e gera agregações clonais (Ottaway, 1973).

As anêmonas são animais ecologicamente muito bem sucedidos (Carlgren, 1949) e apresentam uma ampla distribuição batimétrica, habitando águas costeiras e profundas em todo o mundo, sendo particularmente abundantes em oceanos tropicais. São encontradas sobre recifes, algas, troncos, conchas de bivalves, em paredões rochosos ou enterradas na areia (Harland e Davies, 1997). A maioria passa a vida inteiramente presa ao substrato pelo seu disco pedal adesivo, algumas apresentam adaptação no disco pedal que a permite obter movimentos natatórios em busca de uma área mais favorável para sobrevivência (Ellis *et al.*, 1969, Ottaway, 1978) ou para fugir de predadores (Houtman *et al.*, 1997).

As anêmonas realizam diversas formas de associações harmônicas com outros animais, tais como a epibiose em conchas de gastrópodes (Hand, 1975, Ross, 1975, Ross e Zamponi, 1982) e em braquiúros (Nogueira Jr *et al.*, 2006). Um dos mais conhecidos é o mutualismo com peixes-palhaço (Mariscal, 1970,

Dunn, 1981, Arvedlund, 2006); simbiose com zooxantelas (Bates, 2000). Cerca de 1137 espécies de anêmonas-do-mar são conhecidas mundialmente, das quais 42 ocorrem no Brasil (Fautin, 2011). Entretanto, são escassos os estudos ecológicos e taxômicos com representantes do grupo na região costeira de nosso país, assim como a maioria dos Cnidaria no geral (Migotto *et al.*, 1999).

Fatores físicos como temperatura e umidade do ar podem causar efeitos deletérios, ou até mesmo levar anêmonas-do-mar à morte, através da dessecação (Ottaway, 1973). A investigação dos efeitos de temperaturas em cnidários é apontada como uma boa escolha, principalmente nas anêmonas, por representarem um modelo experimental interessante para entender as respostas às temperaturas (Reitzel *et al.*, 2013). Assim como outros invertebrados marinhos, anêmonas possuem a habilidade de se regenerar rapidamente, o que facilita a reprodução clonal. Indivíduos geneticamente idênticos podem ser usados em experimentos para diferenciar efeitos genéticos e interações do genótipo com ambiente, como já realizados com outros cnidários (Shick *et al.*, 1979, Shick e Dowse 1985, Zamer *et al.*, 1999). Efeitos de mudanças ambientais, como o aumento de temperatura, podem ser especialmente relevantes para aqueles organismos que, sendo sésseis ou com motilidade reduzida, não poderiam mover-se para águas mais frias (Galli *et al.*, 2017). Além disso, como citado anteriormente, esses organismos apresentam uma organização morfológica simples, devido à ausência de sistemas de órgãos especializados, as anêmonas, e outros organismos similares, podem fornecer informações sobre os aspectos mais fundamentais (celulares e moleculares) sobre limites fisiológicos.

### **1.3.1. *Anemonia sargassensis***

O gênero *Anemonia* está presente mundialmente em regiões tropicais e sub-tropicais. Está amplamente distribuído ao longo das costas do Atlântico Oeste (EUA, Canadá, Mar do Caribe), bem como no Atlântico leste dos Açores (Portugal) e no Mar Mediterrâneo (Espanha) (Hartog, 1995, Vidolin, 2007, Felder e Camp, 2009, Borges *et al.*, 2010). *Anemonia sargassensis* (Hargitt, 1908) é o nome válido para as espécies ocorrentes no Atlântico, sinonímia de

*A. antillensis* e *A. melanaster* (Fautin, 2011). *Anemonia sargassensis* é considerada uma espécie nativa no Brasil, com distribuição geográfica no Ceará, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina.

O padrão de cores desses animais é basicamente uma coloração vermelho escuro, por vezes vermelho brilhante, ou de aparência rosada. O entorno do disco oral apresenta um padrão típico de cor esbranquiçada, laranja, rosa e vermelho escuro (Corrêa, 1964, Ocaña *et al.*, 2007, Vidolin, 2007). Esta espécie é limitada ao infralitoral, não produz muco protetor como outras anêmonas para viver na zona entremarés. Apresenta comumente reprodução assexuada por fissão longitudinal. Os indivíduos coletados para realização deste estudo apresentavam coloração forte, vermelho escuro, e um diâmetro do disco pedal de cerca de 2 cm (Figura 1).

### **1.3.2. *Diadumene lineata***

*Diadumene lineata* tem muitas sinonímias: *Aiptasiomorpha luciae*, *Diadumene luciae*, *Haliplanella luciae*, *Haliplanella lineata*, *Sagartia davisii*, *Sagartia lineata* e *Sagartia luciae* (Manuel, 1981). Esta espécie não se limita às áreas de infralitoral, sendo típica da zona entremarés, ocorrendo nas faixas superiores dessa região, preferencialmente em baías protegidas e estuários, raramente em mar aberto (Atoda, 1973, Williams, 1973, Manuel, 1981). É conhecida por ser capaz de tolerar extremas variações de temperatura (Johnson e Shick, 1977, Shick, 1976). Além disso, apresenta grande resistência a variações na salinidade (Manuel, 1981, Podbielski *et al.*, 2016). Durante a exposição a extremos ambientais é capaz de secretar grande quantidade de muco, formando uma espécie de envoltório para se proteger. *D. lineata* reproduz-se principalmente assexuadamente por fissão longitudinal e menos comumente por laceração pedal (Pires, 1987). É capaz de formar grandes clones, apresentando indivíduos bem próximo uns dos outros, essa formação de grupo parece facilitar a captura de alimentos. A grande tolerância ecológica que apresenta é um dos fatores que lhe garante sucesso como uma espécie colonizadora (Johnson e Shick, 1977).

*D. lineata* é reportada como uma espécie nativa da costa do Japão (Mc Murrich, 1921, Stephenson 1928, Fuller, 2007). No entanto, é cosmopolita e está entre os cnidários de mais ampla distribuição, com ocorrência registrada nos dois lados do oceano Pacífico e Atlântico, mares do Norte e Mediterrâneo (Williams, 1973, Podbielski *et al.*, 2016). *D. lineata* foi registrada no Brasil primeiramente em 1977, com exemplares coletados no Rio de Janeiro (Belém e Monteiro, 1977). Atualmente este antozoário só foi relatado mais ao sul no estado do Paraná (fonte: <http://www.marinespecies.org/>).

Os indivíduos coletados para este trabalho apresentam a coluna com listras de cor laranja, típico aspecto registrado para esta espécie, e com diâmetro de aproximadamente 0,6 cm (Figura 1). Durante a coleta, foi encontrada apenas uma pequena população desta anêmona em uma área limitada. Segundo relatos da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora de Oliveira Pires, associada do Departamento de Invertebrados do Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro *D. lineata* era abundante na Baía de Guanabara há cerca de 30 anos, quando a mesma realizou um estudo sistemático de espécies da ordem Acontaria e coletou indivíduos dessa espécie em diferentes pontos da Baía de Guanabara (Pires, 1987).



Figura 2 – *A. sargassensis* com diâmetro do disco pedal de aproximadamente 2 cm (esquerda) e *D. lineata* com aproximadamente 0,6 cm (direita).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar a faixa de tolerância de temperatura nas anêmonas-do-mar *A. sargassensis* e *D. lineata*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Identificar o limite superior de tolerância térmica de cada espécie.
- Analisar o efeito do aumento de temperatura na fisiologia e comportamento das espécies.

### 3. HIPÓTESES

1.  $H_{01}$ : O aumento de temperatura não provoca quaisquer efeitos sobre as anêmonas-do-mar *A. sargassensis* e *D. lineata*.
2.  $H_1$ : O aumento de temperatura provoca estresse térmico nas anêmonas-do-mar *A. sargassensis* e *D. lineata* alterando suas respostas fisiológicas e comportamentais.
3.  $H_{02}$ : O limite superior de tolerância térmica não difere entre as duas espécies.
4.  $H_2$ : O limite superior de tolerância térmica difere entre as duas espécies.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Global approach by modular experiments (GAME)

O *GAME* (*Global Approach by Modular Experiments*) é um programa de treinamento internacional para estudantes organizado pelo instituto GEOMAR da Universidade de Kiel, Alemanha. Este programa envia estudantes para diferentes locais ao redor do mundo todos os anos, onde realizam experimentos biológicos e ecológicos relevantes, abordando tópicos urgentes. A pesquisa é realizada por pares bi-nacionais de estudantes sendo um deles de origem alemã. A proposta do programa é que todas as equipes realizem os mesmos experimentos, porém em diferentes sistemas e países. Como consequência, os resultados podem ser comparáveis e as questões globais discutidas. O projeto é dividido em três partes: um mês de preparação em Kiel, seis meses no país de origem conduzindo os experimentos e depois desse período todos retornam a Kiel para iniciar as análises e apresentar os dados em outras universidades alemãs.

No *GAME* 2015, participaram os países: Indonésia (Bogor), País de Gales (Bangor), Portugal (Madeira), Japão (Akkeshi), Chile (Coquimbo), Israel (Haifa) e Brasil (Niterói). Desta forma, uma ampla gama de latitudes, hemisférios e diferentes oceanos foram cobertos. O objetivo do *GAME* 2015 foi identificar o limite de tolerância térmica superior das anêmonas-do-mar, investigar a correlação com as latitudes e dar previsões para sistemas ecologicamente diferentes.

### 4.2. Coleta

Exemplares de *Anemonia sargassensis* foram coletados em abril e maio de 2015 na praia de Itaipu, em Niterói (22,972126°S, 43,046422°W, temperatura: 21°C, salinidade: 35). Como esta espécie é muito comum na região e na tentativa de evitar clones de amostragem, os indivíduos foram coletados de forma aleatória, mas respeitando uma distância mínima de aproximadamente 5m uns dos outros

A outra espécie utilizada no experimento foi *Diadumene lineata*, coletada na Armação de Búzios nos meses de abril e junho (22.741780°S, 41.877053°W, temperatura: 22°C, salinidade: 35 PSU). Diferentemente da primeira espécie, essa é bastante rara e foi encontrada apenas em uma área restrita; os indivíduos estavam incrustados na porção submersa de uma única boia de barco. Sendo assim, é possível que tenham sido coletados clones, com baixa variabilidade genética.

As coletas foram realizadas durante as condições de maré baixa para garantir que os indivíduos viessem de uma população verdadeiramente submersa. Todos os animais foram coletados em mergulho livre em profundidades entre 0,2 - 0,5 m. Os mesmos foram retirados cuidadosamente de um substrato rochoso com auxílio de espátula, e em seguida transferidos para pequenos recipientes plásticos com tampas, os quais foram preenchidos com a própria água do mar de onde ocorreu a coleta (Figura 3). Estes compartimentos foram mantidos em caixas de isopor até a chegada ao laboratório.



Figura 3 - Áreas de coleta marcadas em x: Praia de Itaipu (Niterói) e Praia dos Ossos (Armação de Búzios)



Figura 4 - Recipientes utilizados após a coleta para o transporte até o laboratório.

### 4.3. Manutenção e aclimação dos indivíduos

As anêmonas-do-mar foram transportadas diretamente para o laboratório dentro do intervalo de 1-6 h, onde foram transferidas para vários aquários plásticos com volume de 5 L, completamente preenchidos com água do mar e devidamente aerados. Em cada aquário havia um número máximo de cinco animais. Foi realizada manualmente a troca de água a cada dois dias. A temperatura da água em que os animais ficaram acondicionados foi cerca de  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , a temperatura média da água no mês de julho, agosto e setembro (meses durante os quais ocorreria o experimento principal) em Niterói e Búzios (fonte: [www.seatemperature.org](http://www.seatemperature.org)). Os animais foram alimentados com náuplios de artêmias uma vez ao dia, *ad libitum*. Eles foram mantidos nas mesmas condições de luz e a um ciclo natural de claro/escuro (12/12h). Sob as condições de manutenção, nenhum indivíduo morreu.

O sistema de reciclagem da água correspondeu a um volume total de 1000L. Para a renovação, a mesma fluía cerca de 24 a 30 vezes por dia através de tanques de aquário que continham dois filtros de carbono ativado, várias camadas de conchas, *bio balls* e dois *skimmers* (desnatadores a bomba d'água) em funcionamento contínuo. Foi realizado o monitoramento da qualidade da água que fluía pelo sistema de renovação e da água que preenchia as unidades experimentais, controlando regularmente seus parâmetros físico-químicos. A qualidade da água renovada através dos tanques de aquário foi verificada uma vez por semana. Durante o estudo piloto, a qualidade da água dentro das unidades experimentais foi verificada todos os dias e durante o estudo principal, uma vez por semana. Os parâmetros observados, os kits de testes utilizados e os limites de segurança foram os seguintes:  $\text{NH}_3$ , Teste de amônia tóxica Labcon  $<0,25$  ppm;  $\text{NO}_3$ , kit teste de nitrato Tetra  $<5$  mg/l;  $\text{NO}_2$ , kit teste de nitrato Tetra,  $<0,25$  ppm; salinidade, 35 PSU;  $\text{O}_2$ , 8-9 mg/l; pH 7,5-8,4 (Grasshoff *et al.*, 1999).

Para os experimentos, os animais foram mantidos individualmente em unidades experimentais com volume de 0,66 L. Para alimentar as anêmonas construiu-se no laboratório uma estação onde náuplios de artêmias foram

cultivados. Utilizou-se 3 garrafas plásticas com volume de 1 L de água (salinidade 5-10 PSU), as quais recebiam tubos de aeração reguláveis. Aproximadamente 1,2 g de ovos de *Artemia franciscana* (Sanders®) foram adicionados a cada garrafa. Após 3 dias foi possível recolher os náuplios. Os animais foram alimentados uma vez por dia (Chintiroglou e Koukouras, 1992). Uma porção desse alimento em suspensão foi oferecida para cada anêmona e continha aproximadamente 612 desses pequenos crustáceos. Após 24 h quase todas as artêmias haviam sido consumidas. A cada dois dias era realizada a limpeza das unidades experimentais com o auxílio de escovas e feita a troca total de água, com a água reciclada e pré-aquecida. Nos outros dias era realizada a troca de apenas metade da água de cada unidade.

#### 4.4. Modelo experimental

As unidades experimentais foram mantidas em um tanque construído sob medida por madeira, isolado com isopor e forrado com uma lona (Figura 4 e 5). Cada tanque de água era aquecido por uma haste de aquecimento elétrica (SCHEGO Heizer, 300 Watt, 230 V). Para garantir que a água dentro dos tanques obtivessem uma temperatura uniforme, uma bomba submersível (SUNSUN, JP-022 MULTI-FUNCTION SUBMERSIBLE PUMP) promoveu a ciclagem da água aquecida a todo o momento. As unidades experimentais foram tampadas para evitar a evaporação da água do mar.



Figura 5 - Tanque visto de cima (esquerda); unidades experimentais dentro do tanque (direita)

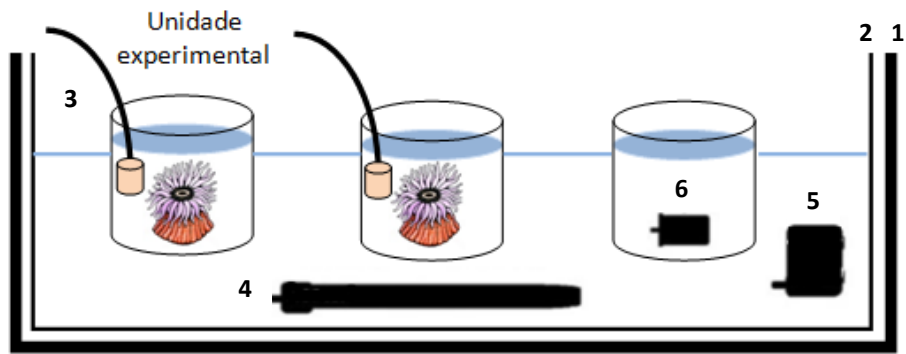


Figura 6 - Delineamento do desenho experimental: Tanque com água isolado por isopor (1), forrado por lona (2), pedra de aeração para cada unidade experimental (3), aquecedor (4), bomba submersa (5) para manter a temperatura homogênea e *data logger* (6).

Quando necessário era adicionado mais água fresca para compensar a evaporação dentro dos tanques. Cada unidade continha aeração constante, através de pedras de aeração conectadas a um compressor de ar (YUTING ACO 45 Watt 0,03 MPa 50 L/min ACO 003). Para garantir que as temperaturas de cada tanque seriam mantidas constantes foram instalados registradores de temperatura HOBO (Onset) dentro de cada um deles, os quais registraram a temperatura da água ao longo das seis semanas (Figura 6).

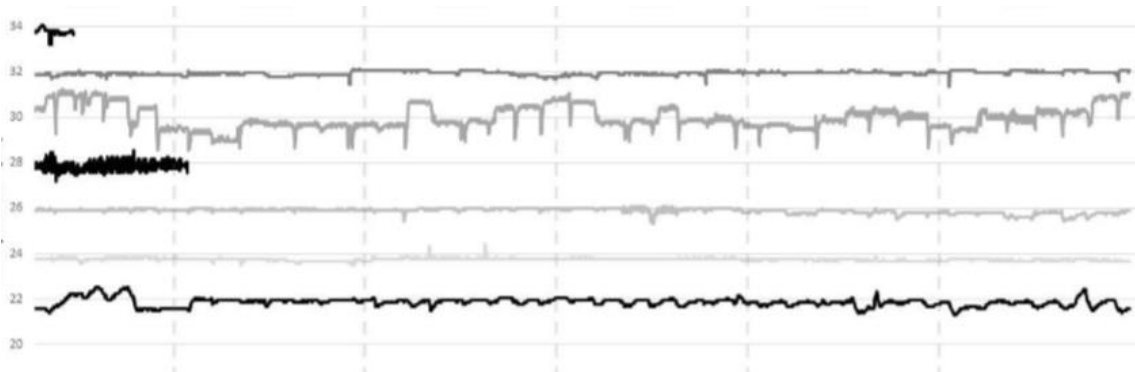


Figura 7 – Registros das temperaturas nos tanques de água dos respectivos tratamentos durante o experimento principal. *A. sargassensis* é representado nos grupos 22°C, 30°C, 32°C e 34°C. *D. lineata* é representado nos grupos 22°C, 24°C, 26°C e 28°C. As linhas pontilhadas verticais representam cada semana do experimento.

Para aclimatar os animais às condições laboratoriais, os mesmos foram mantidos por quatro semanas no laboratório antes de iniciar os experimentos. Após este tempo foi realizado um aquecimento progressivo dos tanques de água até que cada grupo experimental atingisse às suas respectivas temperaturas. A taxa de aquecimento foi de + 2°C por dia (Figura 7).

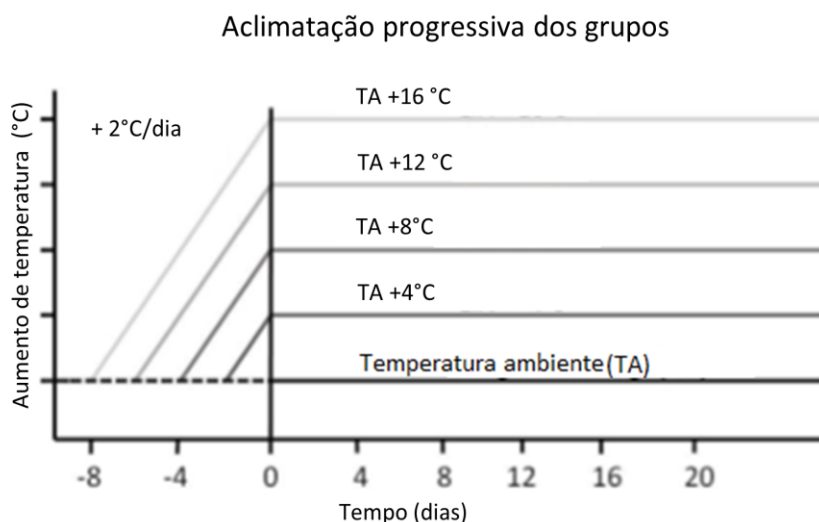


Figura 8 - Aquecimento progressivo dos tanques de água até que cada tratamento atingisse às suas respectivas temperaturas

Iniciou-se o aumento progressivo de temperatura pelo grupo que possuiria a temperatura alvo mais elevada durante o experimento, o segundo tanque em que houve o aumento de temperatura foi o grupo com a segunda maior temperatura alvo, e assim progressivamente até que todos os grupos experimentais atingissem a temperatura desejada no final dessa fase de aclimação. A partir deste processo, todos os grupos experimentais atingiram a temperatura alvo no mesmo dia, sendo denominado o “dia 0” do experimento.

Após o período de aclimação, foi realizado um estudo piloto com quatro temperaturas diferentes, começando com a temperatura média do mês de julho, agosto e setembro a 22°C (fonte: [www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br)). Na tentativa de cobrir uma ampla faixa de temperatura os outros grupos apresentaram diferenças de + 4°C (Figura 7). Sendo assim os tanques de água tiveram as seguintes temperaturas: 22°C, 26°C, 30°C e 34°C. O objetivo foi encontrar a faixa de temperatura que seria crítica para esses animais. Tal faixa crítica foi



considerada entre o grupo de temperatura em que mais de 50% das anêmonas sobreviveram e o grupo de temperatura em que mais de 50% desses organismos morreram. Cada tanque de água continha 20 unidades experimentais, sendo 10 de cada espécie. A duração do estudo piloto foi de três semanas. A faixa de temperatura crítica obtida para *D. lineata* foi entre 26°C e 30°C e para *A. sargassensis* entre 30°C e 34°C.

Com base nos resultados obtidos no estudo piloto, no experimento principal foi acrescentada uma temperatura intermediária entre o intervalo identificado como crítico. O objetivo era encontrar o limite máximo de temperatura: a temperatura tolerável mais elevada em que 50% das anêmonas conseguiram sobreviver. Os indivíduos do estudo piloto que experimentaram as mesmas temperaturas que o experimento principal foram aproveitados. Enquanto que os novos animais adicionados somente para o experimento principal foram submetidos ao mesmo período de aclimação com aquecimento progressivo de + 2°C até que cada um atingisse às suas respectivas temperaturas. Obtivemos 15 réplicas de cada espécie por tratamento. O estudo principal obteve a duração de 42 dias. As réplicas de *A. sargassensis* foram colocadas em tanques com temperaturas de: 22°C (grupo de controle), 30°C, 32°C e 34°C. Durante a aclimação foi previsto que indivíduos de *D. lineata* não sobreviveriam a 28°C. Logo, foi preferível acrescentar uma temperatura de 24°C. As réplicas dessa espécie foram colocadas em tanques de água com: 22°C (grupo de controle), 24°C, 26°C e 28°C (Figura 8). O maior tanque foi o com temperatura de 22°C (grupo de controle) de aproximadamente 120 L, os tanques com os grupos de 24°C e 26°C obtinham aproximadamente 85 L e os dos grupos 28°C, 30°C, 32°C e 34°C aproximadamente 30 L cada um deles.

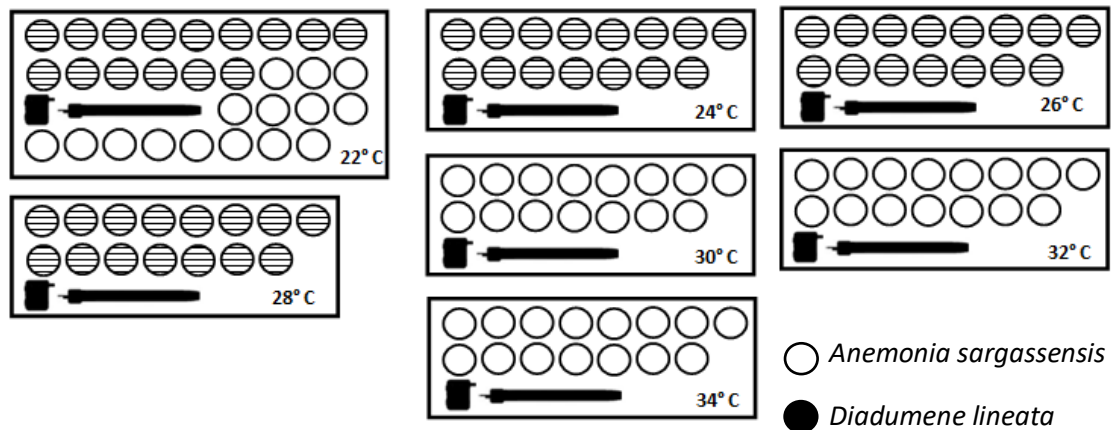


Figura 9- Tanques com diferentes regimes de temperatura durante o experimento principal.

#### 4.5. Variáveis de resposta

Tabela 1 - Variáveis de resposta e a frequência com que foram verificadas.

Variáveis de resposta	Frequência de observação/medidas
Sobrevivência	Diariamente
Biomassa	Início e fim do experimento
Motilidade	Dia 0, 21 e 42
Respiração	Dia 0, 21 e 42
Fixação	Diariamente
Refixação	Dia 0, 21 e 42
<i>Habitus</i>	Diariamente
Reexpansão	Dia 0, 21 e 42
Reprodução assexuada	Diariamente
Estresse térmico agudo	3 dias após evento de fissão

##### 4.5.1. Sobrevivência

Esta resposta foi verificada diariamente. O indivíduo foi considerado morto quando sua aparência mudava claramente (Figura 9) e não havia mais reação aos estímulos externos. Foi comparado entre os diferentes grupos de temperatura através da Análise de Sobrevivência (*event history analysis*), o que nos permitiu mensurar o evento ocorrido (morte) em um dado período no tempo. As curvas Kaplan-Meier ajudaram a visualizar os eventos ao longo do

tempo. Para isto, foi registrado desde o início do experimento o dia exato em que o indivíduo morreu. A sobrevivência foi analisada estatisticamente via *log-rank*.

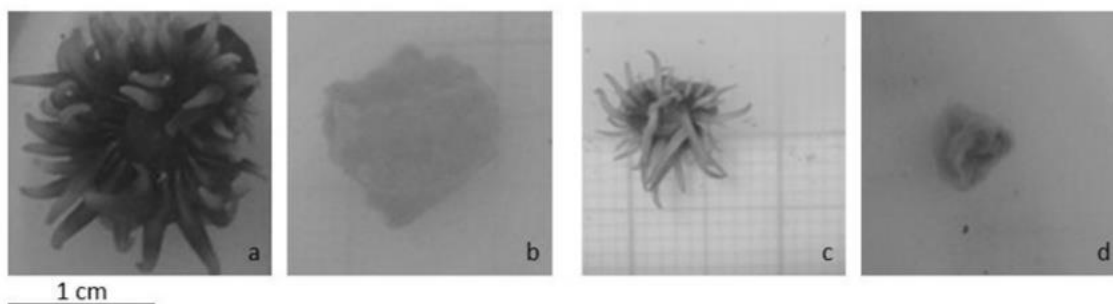


Figura 10 - *A. sargassensis* viva (a) e morta (b); *D. lineata* viva (c) e morta (d).

#### 4.5.2. Biomassa

A biomassa úmida e seca dos animais foi obtida. Para determinara biomassa úmida, os animais foram separados, secos com o auxílio de um papel toalha até que não soltassem mais água e foi verificada a biomassa dos animais em uma balança de precisão. Esta medida foi considerada como biomassa úmida. A mensuração foi realizada 2 vezes: uma vez antes da aclimação iniciada (5 dias antes do dia 0 – ver Material e Métodos 4.3) e a segunda vez no final (dia 43). Para comparar a biomassa durante o tempo do experimento entre os níveis de temperatura, calculou-se a diferença da biomassa úmida final e inicial dos indivíduos isolados antes da aclimação e no final do experimento (dia 43). Para obtenção da biomassa seca os animais foram secos em estufa por 3-4 dias a 75°C até que os valores encontrados permanecessem constantes. Esta medição foi realizada uma vez no final do experimento. Todas as medidas foram realizadas com a mesma balança.

#### 4.5.3. Respiração

Esta resposta foi medida três vezes, no dia 0, dia 21 e dia 42. Durante o estudo piloto houve a tentativa de medir a respiração de ambas as espécies, mas só foi possível alcançar sinais claros para *A. sargassensis*, logo *D. lineata* foi excluída dessa variável de resposta no estudo principal.

Foi utilizado um balão Erlenmeyer de vidro de 125 ml como uma câmara hermética. Esta câmara foi preenchida com água do mar filtrada até a tampa, em seguida o animal foi transferido para o frasco. Após meia hora de aclimação e recuperação da transferência, foi medido o primeiro valor com o oxímetro (WTW Oxi 3205) para todos os indivíduos em cada tratamento. Em seguida o frasco foi fechado com o cuidado para não deixar bolhas de ar presas no seu interior, minimizando a chance do oxigênio se difundir no corpo de água. Após duas horas foi medido o segundo valor com o oxímetro. Durante um dia de medição, foi quantificado o consumo de oxigênio de todos os animais de *A. sargassensis*. Para fins analíticos, o consumo de oxigênio foi padronizado em mg de O<sub>2</sub> por litro por hora por grama de biomassa seca. Durante a medição da respiração, a atividade foi constantemente observada, porque um aumento de movimento ou a contração do animal poderiam ter influenciado no consumo de oxigênio. Todos os indivíduos estavam com seus tentáculos expandidos durante o processo.

#### **4.5.4. Fixação**

O status de fixação foi verificado diariamente, observando se o indivíduo estava preso ou solto da unidade experimental.

#### **4.5.5. Refixação**

Para medir o tempo de refixação, os indivíduos foram desprendidos propositalmente da unidade experimental e foi monitorado o tempo até que ele se fixasse novamente. O status de fixação foi verificado após ½ hora, 1 hora, 2 horas e 4 horas após o destacamento. No final, foram obtidos dados ordinais com 4 categorias, compreendendo os intervalos de tempo.

#### **4.5.6. Motilidade**

O movimento das anêmonas foi investigado três vezes durante as seis semanas: no início (dia 0), no meio (dia 21) e no final (dia 42). Para isso, a localização do animal foi marcada e controlada após 24h. Foram produzidos

dados nominais (sim, o indivíduo moveu / não, não se moveu). Os animais que estavam soltos da unidade experimental não foram contados.

#### 4.5.7. *Habitus*

Outro parâmetro comportamental foi o *habitus* das anêmonas. Com a mudança de condições ou incômodo, esses animais são capazes de contrair seu corpo alterando sua forma. Foi aplicado o índice desenvolvido por Podbielski *et al.* (2016), que compreende a cinco estágios morfológicos baseados no grau de abertura dos tentáculos do disco oral e na extensão do pólip (Figura 10). O estágio zero representa a contração completa do animal onde nenhum tentáculo era visível e a coluna encurtada. O estágio quatro compreende o animal completamente estendido com a coluna é destendida ao máximo e todos os tentáculos visíveis. Os estágios um a três são formas de transição entre estes dois extremos. Estágio um: coluna contraída e apenas pontas do tentáculo visíveis; estágio dois: coluna ligeiramente contraída, tentáculos encurtados bem visíveis; estágio três: coluna ligeiramente ereta, tentáculos estendidos. O *habitus* das anêmonas foi uma resposta avaliada diariamente.

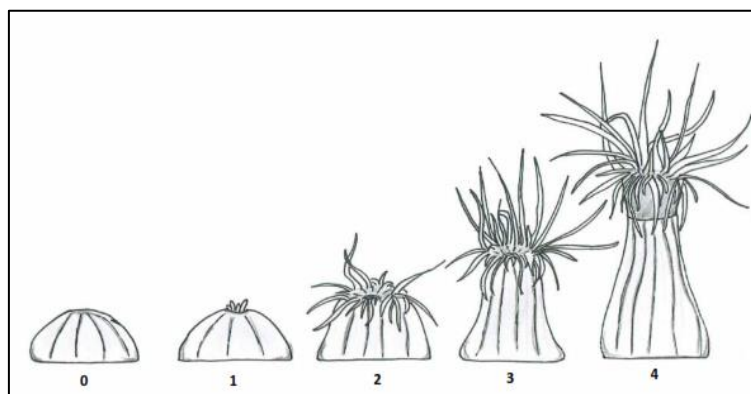


Figura 11- Estágios morfológicos do *habitus* (Podbielski *et al.*, 2016)

#### 4.5.8. Reexpansão

Para a experiência de reexpansão, os animais foram perturbados cuidadosamente com auxílio de uma pipeta para que contraíssem completamente seus tentáculos e o tempo que os mesmos levaram para voltar

a estender seus tentáculos foi registrado dentro do período de 120 segundos. Os animais que não reagiram ou não contraíram completamente como reação ao distúrbio foram excluídos. Medir o tempo necessário para a reexpansão também foi um experimento comportamental. Este experimento foi conduzido três vezes: no dia 0, dia 21 e dia 42.

#### 4.5.9. Reprodução assexuada

A reprodução assexuada foi avaliada diariamente. Foi observado o evento de fissão no qual o tecido se alonga em direções opostas, torna-se mais fino e rasga perpendicular ao eixo do alongamento (Figura 11). No final, o indivíduo é dividido em duas partes quase iguais. O evento de fissão foi registrado quando já não havia tecido de conexão entre as duas metades. Um dos indivíduos resultantes foi retirado e mantido em uma unidade experimental separada no mesmo tanque de água. No caso de as duas anêmonas resultantes de um evento de fissão diferirem em tamanho, era removido o menor.

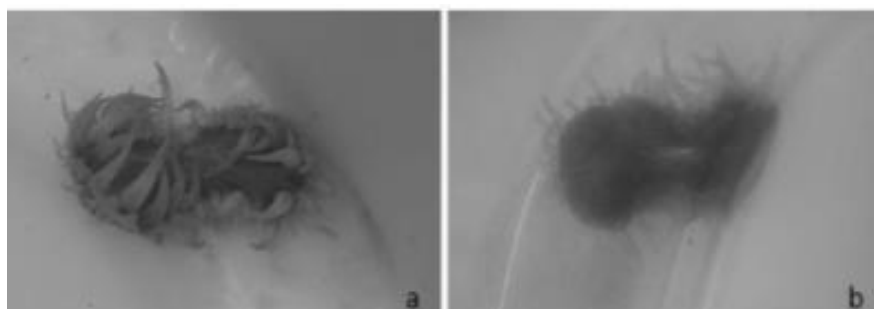


Figura 12 – *D. lineata* durante o evento de fissão (a = vista de cima, b = disco basal visto de baixo, através da unidade experimental).

#### 4.5.10. Estresse térmico agudo

Após 3 dias, as anêmonas resultantes de cada evento de fissão que foram retiradas e mantidas em unidades experimentais separadas, foram transferidas para outro tanque de água de temperatura equivalente ao tratamento ao qual pertencia, onde foi realizado o experimento de estresse térmico agudo. A temperatura subiu constantemente a uma taxa de 1°C por hora (Nguyen *et al.*, 2011) até o animal morrer.

#### 4.6. Análises estatísticas

Para examinar os efeitos da temperatura sobre o comportamento e a fisiologia das anêmonas-do-mar, foram realizados diferentes testes estatísticos. Os valores médios e desvios-padrões foram calculados para: a mudança de biomassa úmida, o tempo necessário para re-expansão após um distúrbio, a diferença de temperatura adicional no estresse térmico agudo e a taxa de respiração.

Parte dos resultados foi visualizada como gráficos Boxplots, com mediana, dois quartis médios (mostrando 25% - 75% dos dados) e dois quartis extremos (mostrando 0%-25% e 75 %-100% dos dados). As unidades experimentais de uma espécie submetidas a um tratamento de temperatura foram consideradas como réplicas. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk (Shapiro, S., Wilk, B., 1965) e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Fligner-Killeen ou pelo teste de Bartlett (Snedecor, G., Cochran, G., 1991). Para os dados distribuídos não normais foram realizadas transformações logarítmicas.

Para os dados de sobrevivência foi realizada uma Análise de sobrevivência (*event history analysis*). As curvas Kaplan-Meier ajudaram a visualizar os eventos ao longo do tempo. A sobrevivência foi analisada estatisticamente via *log-rank*.

Os dados das diferenças de biomassa encontrados nos tratamentos de *D. lineata* foram transformados pela raiz quadrada de  $X+0,5$  para atender à premissa da normalidade. Após tal transformação foi realizada a análise estatística ANOVA unifatorial, com o teste *a posteriori* de Tukey. E o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados das diferenças de biomassa encontradas nos tratamentos de *A. sargassensis* não atenderam a premissa da normalidade, mesmo depois de transformados pelo  $\log_{10} X+1$ . Ainda assim, foi analisado a partir da ANOVA unifatorial com o teste *a posteriori* de Dunnett. Além do teste não paramétrico *U* de Mann-Whitney. A relação entre biomassa úmida e seca foi analisada através de uma regressão linear.

A análise estatística *Repeated Measures* ANOVA foi realizada para os dados de: reexpansão, refixação e respiração. O objetivo foi investigar mudanças nos valores médios ao longo de três pontos do experimento (dia 0, dia 21 e dia 42). Os dados das taxas respiratórias encontradas nos tratamentos de *A. sargassensis* foram transformados pelo  $\log_{10} X+1$  para atender à premissa da normalidade. Além da Anova foram realizados os teste a posteriori Tukey e Dunnet, assim como o teste não paramétrico *U* de Mann-Whitney.

A variável de refixação foi testada estatisticamente quanto às diferenças via regressão de Cox. A motilidade foi analisada a partir do teste Qui quadrado em tabelas de contingência. Quanto aos dados do estresse térmico agudo foi realizado o Teste *t* com correção de Welch.



## 5. RESULTADOS

O estudo piloto foi de extrema importância, pois revelou a faixa de temperatura crítica, considerada como o intervalo entre o grupo de temperatura com mais de 50% de animais sobreviventes e aquele com mais de 50% indivíduos mortos. Esta temperatura crítica foi de 30-34°C para *Anemonia sargassensis* e 26-30°C para *Diadumene lineata* (Tabela 2).

Tabela 2- Número de indivíduos sobreviventes nos regimes de temperatura durante o estudo piloto.

<b>Δ Temperatura</b>	<b>Grupos</b>	<b><i>A. sargassensis</i></b>	<b><i>D. lineata</i></b>
+ 0°C	22°C	10	10
+ 4°C	26°C	10	7
+ 8°C	30°C	10	0
+ 12°C	34°C	0	0

### 5.1. Sobrevivência

Ambas as espécies mostraram diferenças estatisticamente significativas quanto à sobrevivência entre os diferentes níveis de temperatura no estudo principal (Tabelas 3 e 4). Em cada tratamento de temperatura 15 réplicas foram utilizadas (Ni). O limite superior de tolerância térmica, o qual mais de 50% dos indivíduos sobreviveram, foi de 30°C para *A. sargassensis*. Durante as seis semanas de experimento, mais de 90% dos animais sobreviveram a este nível de temperatura. No grupo controle (22°C) todos os indivíduos mantiveram-se vivos ao longo do experimento. Mais de 50% dos indivíduos morreram dentro dos 2 primeiros dias no tratamento 32°C, e mantida essas condições, apenas 1 indivíduo sobreviveu até o fim do experimento. No grupo de temperatura mais elevada (34°C), todos os indivíduos morreram no primeiro dia (Figura 13).

O limite superior de tolerância térmica para *D. lineata* foi 26°C. Nestas condições 87% dos animais sobreviveram (13 indivíduos). Nos grupos de 22 e 24°C todos os animais sobreviveram até o final do experimento. Enquanto que os animais do nível de temperatura 28°C morreram dentro de quatro dias (Figura 12).

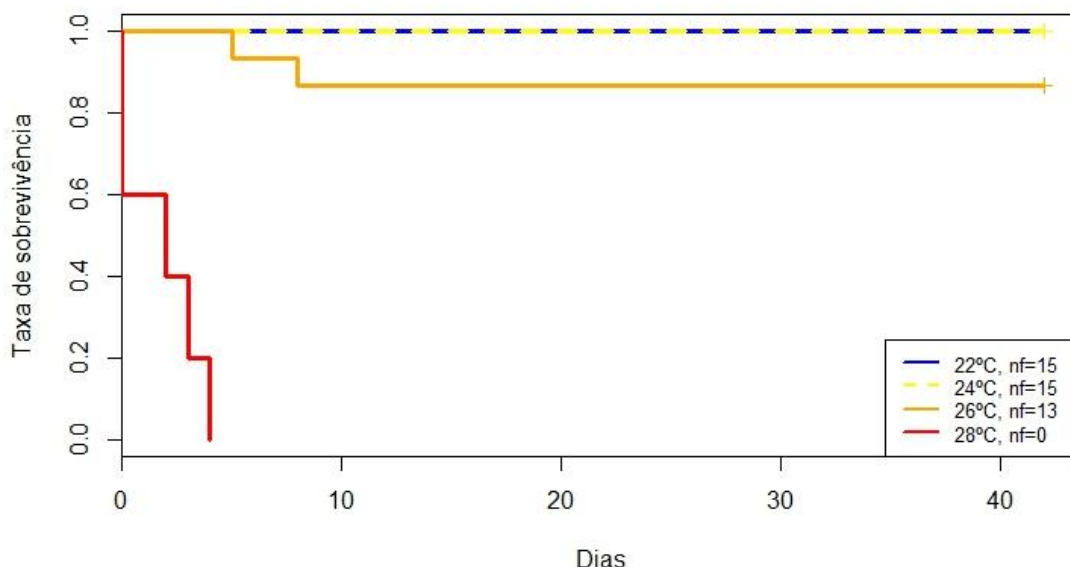


Figura 13 - Sobrevivência de *D. lineata* nos diferentes regimes de temperatura durante o experimento principal. nf = Número de indivíduos ao final do experimento

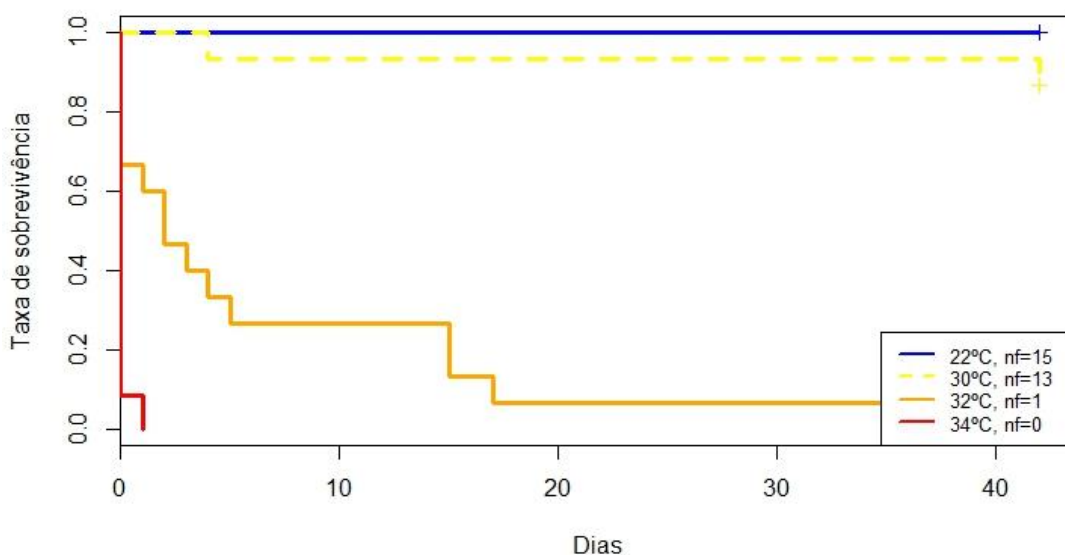


Figura 14 - Sobrevivência de *A. sargassensis* nos diferentes regimes de temperatura durante o experimento principal. nf = Número de indivíduos ao final do experimento

Tabela 3 - Resultados estatísticos da taxa de sobrevivência entre os grupos de tratamentos de *D. lineata* via Log rank.

	Graus de liberdade	Qui-quadrado	<i>p</i>
<b>Tratamento</b>	3	82,4	0

Tabela 4 - Resultados estatísticos da taxa de sobrevivência entre os grupos de tratamentos de *A. sargassensis* via Log rank

	Graus de liberdade	Qui-quadrado	<i>p</i>
<b>Tratamento</b>	3	68,8	<0,0001

## 5.2. Biomassa

A biomassa úmida média antes do dia 0 (ver material e métodos 4.3) do experimento de todos os indivíduos de *A. sargassensis* foi de 0,544 g ( $\pm 0,284$ ) e de *D. lineata* foi de 0,034 g ( $\pm 0,021$ ). Foi realizada uma linha de regressão da biomassa úmida obtida após as seis semanas de experimento (dia 43) em função da biomassa seca, e esta mostrou uma forte correlação. Para *D. lineata*, a biomassa seca explica 99% e para *A. sargassensis* mais de 92% da variabilidade na biomassa úmida (Figuras 14 e 15).

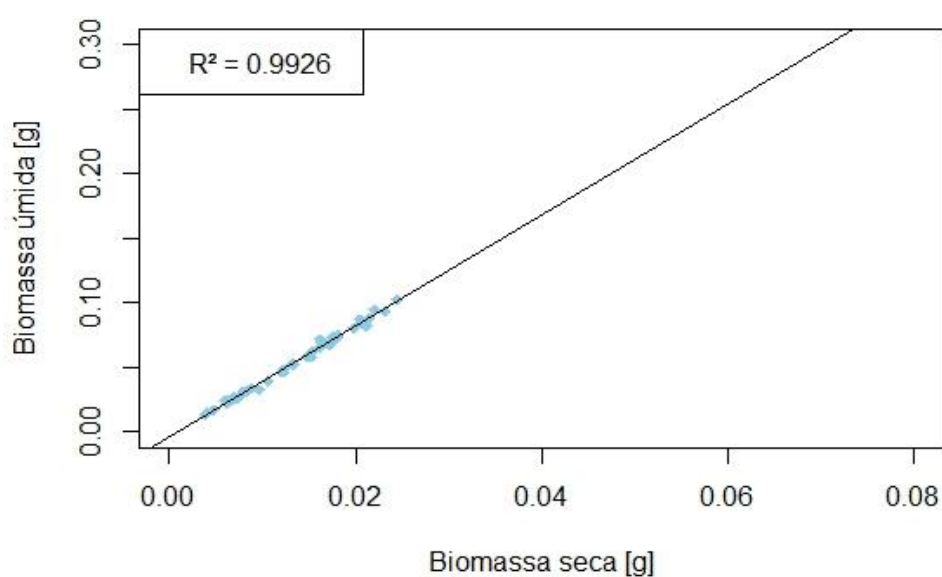


Figura 15 - Correlação entre a biomassa úmida e a biomassa seca de *D. lineata* no final do experimento.

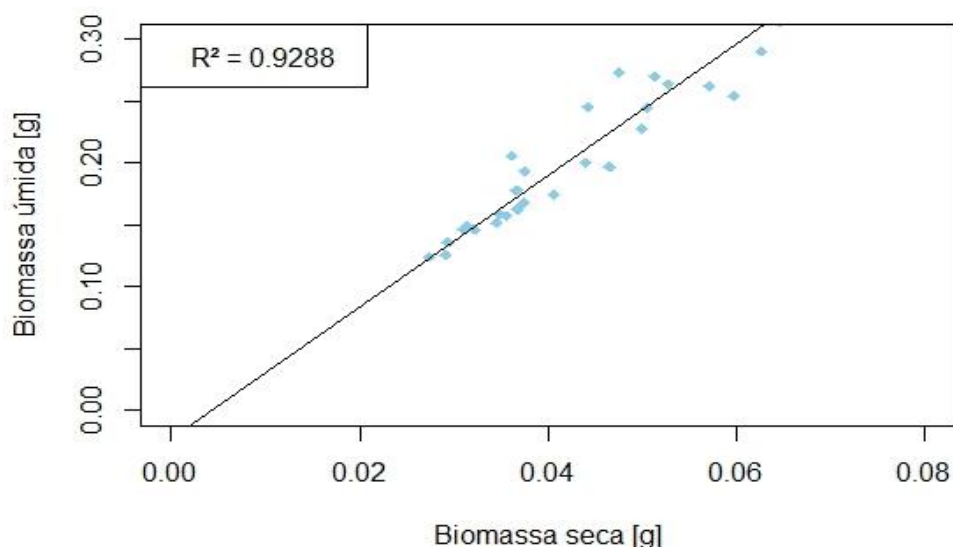


Figura 16 - Correlação entre a biomassa úmida e a biomassa seca de *A. sargassensis* no final do experimento.

A análise estatística ANOVA unifatorial identificou uma diferença significativa das biomassas entre os tratamentos de 22°C, 24°C e 26°C (Tabela 5). Com o teste *a posteriori* de Tukey (MQ = 0,00021, GL = 36), foi identificada que a biomassa dos indivíduos do grupo de 26°C foi significativamente menor em comparação aos dois tratamentos de temperaturas mais baixas (22°C e 24°C). Além disso, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, equivalente à ANOVA:  $H(2, N=39) = 20,58817$   $p < 0,0001$ . Ambos os testes levaram à mesma inferência, ou seja, que as diferenças de biomassa entre os tratamentos foram significativas.

Tabela 5 - ANOVA unifatorial das diferenças de biomassa úmida entre os tratamentos de *D. lineata*

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
<b>Tratamento</b>	0,008	2	0,004	18,93	< 0,0001

Foram comparadas as biomassas dos níveis de temperatura de *D. lineata* e *A. sargassensis* durante o tempo de experimento (Figura 16). Para *D. lineata* observou-se que os animais mantidos em temperatura ambiente (22°C) apresentaram maior ganho de biomassa (+ 0,037 g ± 0,026 g – média ± desvio padrão) comparado aos demais grupos. A biomassa dos indivíduos a 24°C foi ligeiramente reduzida (+ 0,035g ± 0,027g – média ± desvio padrão) em comparação com a dos indivíduos a 22°C. Os animais mantidos a 26°C perderam biomassa durante as seis semanas de experimento (-0,006 g ± 0,004 g – média ± desvio padrão).

Nos dados das diferenças de biomassa encontradas nos tratamentos de *A. sargassensis* foi realizado ANOVA unifatorial que identificou uma diferença significativa entre a biomassa dos tratamentos térmicos de 22°C e 30°C (Tabela 6). Os dados de temperatura de 32°C foram excluídos devido a baixa replicação. Tanto no grupo controle (22°C) quanto no de 30°C, foi verificada uma perda de biomassa úmida. No entanto, na temperatura de 30°C os indivíduos perderam mais biomassa (-0,33g ± 0,19g – média ± desvio padrão) durante as seis semanas do que à temperatura de 22°C (-0,13 g ± 0,08 g –

média  $\pm$  desvio padrão). Com o teste *a posteriori* de Dunnett foi identificado que a perda de biomassa úmida do grupo de 30°C foi significativamente maior quando comparada a do grupo controle. Além disso, foi realizado o teste não paramétrico *U* de Mann-Whitney ( $U=27$ ; teste  $Z = 2,92$ ,  $p = 0,0035$ ). Ambos os testes levaram à mesma inferência, ou seja, que as diferenças de biomassa entre os tratamentos de temperatura foram significativas.

Tabela 6 - ANOVA unifatorial das diferenças de biomassa úmida entre os tratamentos de *A. sargassensis*.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	<i>F</i>	<i>p</i>
<b>Tratamento</b>	0,1303	1	0,1303	10,17	0,00394

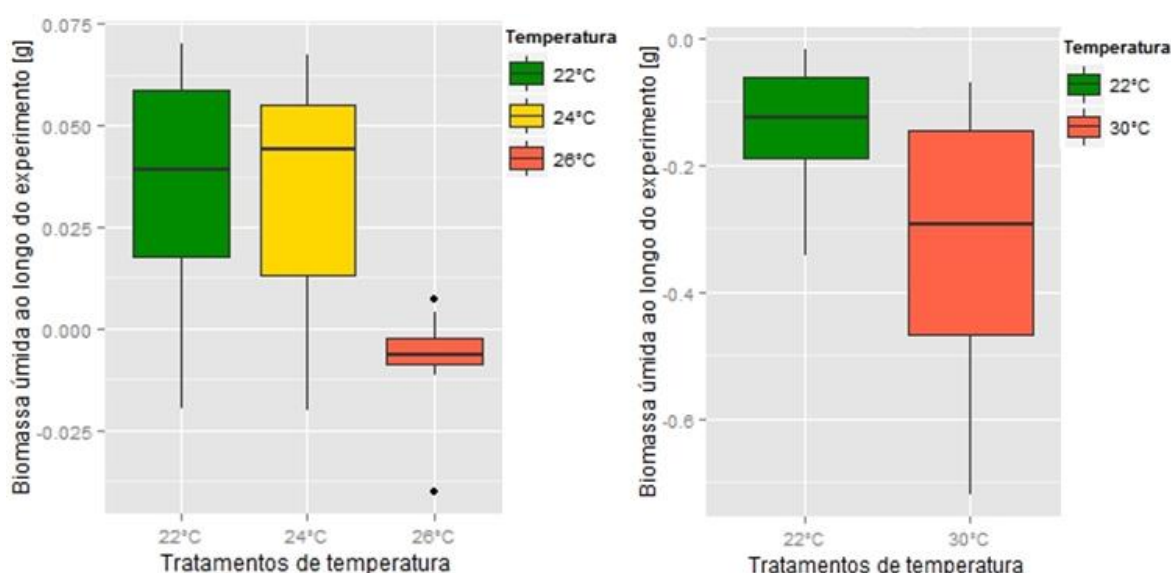


Figura 17- Comparação da mudança de biomassa úmida (final-inicial) de *D. lineata* (esquerda) e *A. sargassensis* (direita) para os diferentes níveis de temperatura.

### 5.3. Fixação

Todos os indivíduos de *D. lineata* sempre estiveram fixados à unidade experimental. *A. sargassensis* apresentou eventos de desprendimento esporádicos. Não houve diferença significativa na taxa de adesão/separação dos indivíduos entre os níveis de temperatura.

#### 5.4. Respiração

A taxa de respiração de *A. sargassensis* nos três tratamentos de temperatura foi medida em três pontos (dia 0, 21 e 42). Os valores de respiração do grupo de 32°C foram excluídos das análises estatísticas devido ao baixo número de réplicas. Na análise dos dados das taxas respiratórias nos tratamentos de *A. sargassensis* houve uma diferença significativa na taxa de respiração entre os tratamentos de temperatura e os dias. A interação da temperatura e do tempo também foi significativa (Tabela 7). Isso significa que tanto o tempo (dias) como o nível de temperatura influenciaram a taxa de respiração. No dia 0, a taxa de respiração média dos indivíduos a 30°C foi de 6,6 O<sub>2</sub> / l / h / g de biomassa seca, enquanto a taxa de respiração a 22°C foi de 2,6 O<sub>2</sub> / l / h / g biomassa seca. O mesmo padrão pode ser observado para o dia 21 e dia 42 com efeito menor (Figura 17). Com o teste *a posteriori* de Tukey (MQ = 0,008, GL = 72, 6), foi identificado que os valores médios de respiração dos indivíduos ao tratamento de 22 °C nos três dias (dia 0: 2.6 O<sub>2</sub>/l/h/g ± 0.8, dia 21: 2.3 O<sub>2</sub>/l/h/g ±0.7 e dia 42: 2.5 O<sub>2</sub>/l/h/g ±0.5) foram bastante constantes e não são significativamente diferentes entre si. As taxas médias de respiração dos indivíduos no grupo de tratamento a 30°C nos dias 21 e 42 não foram significativamente diferentes entre si, enquanto que o valor médio da respiração dos indivíduos no dia 0 é significativamente mais elevado comparado com os valores no dia 21 e 42. Os indivíduos do grupo de tratamento a 30°C reduziram o seu consumo médio de oxigênio do dia 0 ao dia 21 em aproximadamente 2,3 O<sub>2</sub> /l/h/g e do dia 21 para o dia 42 em aproximadamente 0,4 O<sub>2</sub> / l /h/g. Com o teste *a posteriori* de Dunnett foi identificado que a taxa respiratória do grupo de 30°C foi significativamente maior quando comparada à do grupo controle.

Além disso, foi realizado o teste não paramétrico *U* de Mann-Whitney (Dia 0 U=0, teste Z= <0,0001, p=<0,0001; Dia 21 U=5, teste Z= <0,0001, p=<0,0001; Dia 42 U=19, teste Z= <0,0001, p=0,0003). Ambos os testes levaram à mesma inferência, ou seja, que as diferenças na taxa de respiração entre os tratamentos de temperatura e os dias foram significativas.

Tabela 7 - *Repeated Measures* ANOVA das taxas respiratórias de *A. sargassensis* entre os tratamentos de temperatura e os dias.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
Temperatura	1,08	1	1,08	97,372	<0,0001
Dias	0,18	2	0,09	14,028	<0,0001
Dias*Temperatura	0,09	2	0,05	7,713	0,0011

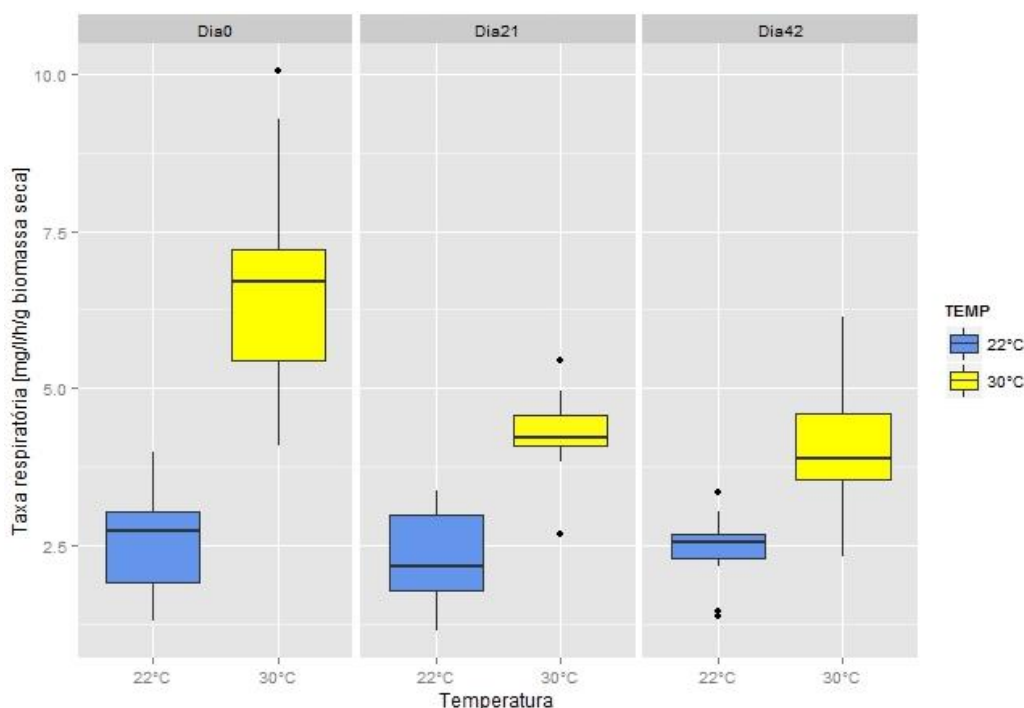


Figura 18 - Taxa respiratória de *A. sargassensis* nos diferentes dias (0, 21 e 42) nos tratamentos de 22°C (n=15) e 30°C (n=14)

## 5.5. Motilidade

Foi observada a motilidade para ambas as espécies. Em *D. lineata*, no dia 0, houve uma atividade crescente com o aumento de temperaturas (Figura 18). Somente indivíduos do grupo de temperatura de 26°C mostraram movimentação em todos os dias de medição (Dia 0, 21 e 42). Além disso, o número de indivíduos do tratamento de 26°C que apresentou movimento foi sempre maior (Dia 0 e 42) ou igual (Dia 21) em relação aos grupos de 22°C e 24°C. A partir do teste Qui Quadrado em tabelas de contingência foi verificado

que a motilidade das duas espécies não é dependente da temperatura. *A. sargassensis* (GL= 1,  $X^2$  dia 0=0,243,  $X^2$  dia 21=0,106,  $X^2$  dia 42= 1,12) e *D. lineata* (GL= 2,  $X^2$  dia 0 =4,32,  $X^2$  dia 21= 2,4,  $X^2$  dia 42= 2,6).

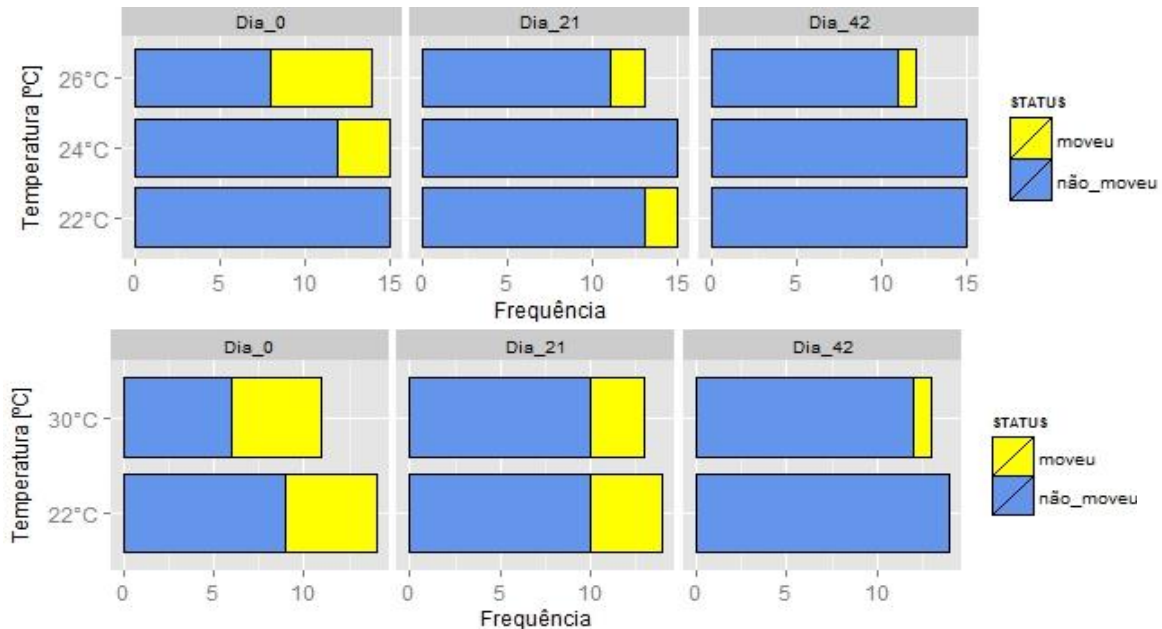


Figura 19- Motilidade de *D. lineata* (em cima) e *A. sargassensis* (embaixo) após 24 horas de observação no dia 0, dia 21 e dia 42 para os diferentes níveis de temperatura.

## 5.6. Reexpansão

O tempo médio de reexpansão para os indivíduos de *A. sargassensis* a 22°C durante os três dias (dia 0, dia 21 e dia 42) foi de 63,3 segundos ( $\pm$  33,4 segundos), enquanto para indivíduos a 30°C foi de 70,4 segundos ( $\pm$  24,5 segundos) e 58,6 segundos ( $\pm$  24,5 segundos) a 32°C. Não foi considerado para o gráfico o tratamento de *A. sargassensis* a 32°C, pois muitos animais morreram até o dia 21 e não restou nenhum até o dia 42 (Figura 19). O tempo médio de reexpansão para os indivíduos de *D. lineata* a 22°C durante os três dias foi de 62,1 segundos ( $\pm$  25,7 segundos), enquanto que para os indivíduos a 24°C foi 73,5 segundos ( $\pm$  27,7 segundos) e 64,0 segundos ( $\pm$  22,8 segundos) a 26 °C (Figura 20).



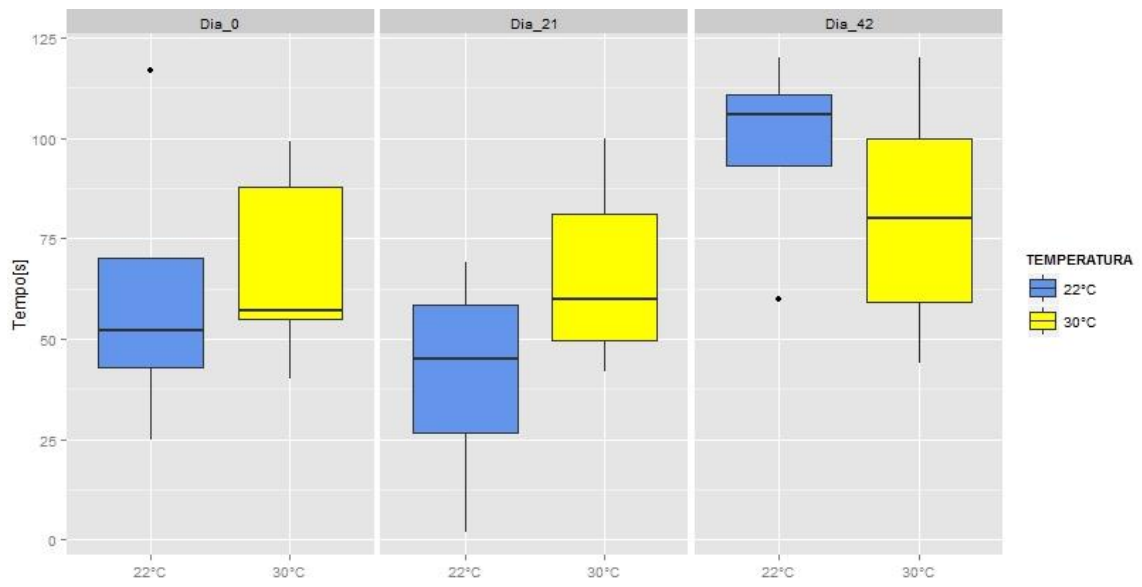


Figura 20 - Tempos de reexpansão *A. sargassensis*

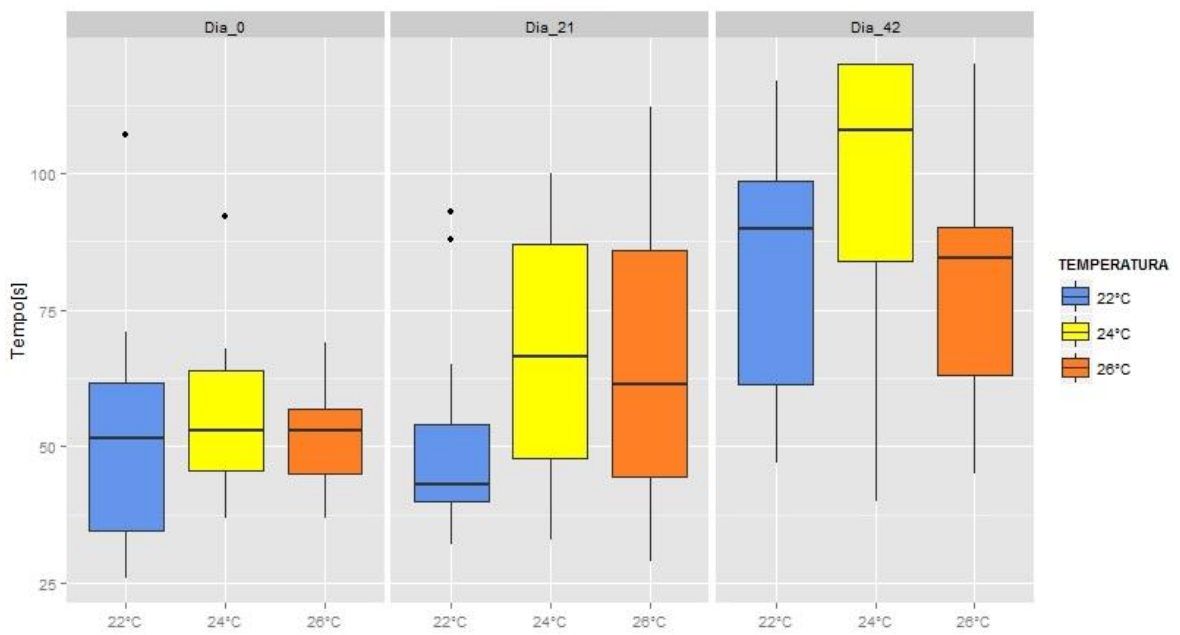


Figura 21 - Tempos de reexpansão *D. lineata*

Foi realizado o teste *Repeated Measures* ANOVA o qual identificou que para espécie *A. sargassensis* nem os tratamentos de temperatura nem os diferentes dias (Dia 0, 21 e 42) tiveram um efeito significativo no tempo de reexpansão dos tentáculos (Tabela 8).

Para os dados de *D. lineata* também foi realizado o *Repeated Measures* ANOVA o qual identificou que os tratamentos de temperatura não tiveram um efeito significativo no tempo de reexpansão, mas houve uma diferença significativa entre os dias (Tabela 9). Com o teste *a posteriori* de Tukey foi identificado que apenas no tratamento de 22°C o tempo médio de reexpansão dos tentáculos foi significativamente diferente entre os dias 0 e 21 quando comparados ao dia 42. Além disso, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, equivalente à ANOVA:  $H(2, N=36) = 10,75948$   $p = 0,0046$ , o qual levou a mesma inferência.

Tabela 8 - *Repeated Measures* ANOVA dos tempos de reexpansão de *A. sargassensis*

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
Temperatura	104	1	104	0,141	0,719
Dias	5283,7	2	2641,9	2,93	0,0864
Dias*Temperatura	2457,1	2	1228,5	1,363	0,2878

Tabela 9 - *Repeated Measures* ANOVA dos tempos de reexpansão de *D. lineata*

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p
Temperatura	0,0783	2	0,0391	1,523	0,2392
Dias	0,5629	2	0,2814	12,412	<0,0001
Dias*Temperatura	0,0499	4	0,0125	0,551	0,69941

## 5.7. Refixação

Em ambas espécies não houve um padrão claro de resposta para esta variável. Após o destacamento provocado, a maioria dos indivíduos refixou-se novamente dentro de duas horas. Não houve diferença significativa nos tempos de refixação entre os tratamentos de temperatura nos três dias em ambas as espécies.

Tabela 10 - Reação de refixação de *A. sargassensis* e *D. lineata* nos dias 0, 21 e 42 testada estatisticamente quanto às diferenças via regressão de Cox.

<i>A. sargassensis</i>	Graus de liberdade	Qui-quadrado	<i>p</i>
Dia 0	2	0,4	0,812
Dia 21	2	0,1	0,732
Dia 42	2	0,8	0,669
<i>D. lineata</i>	Graus de liberdade	Qui-quadrado	<i>p</i>
Dia 0	2	2,3	0,315
Dia 21	2	0,3	0,859
Dia 42	2	3,2	0,199

## 5.8. *Habitus*

A variável de resposta *habitus* foi avaliada diariamente, mas escolhemos representar os dias 0, 7, 14, 21, 28, 35,42 (Figuras 21 e 22). Foi contado o número de indivíduos em cada tipo de *habitus* (Figura 10 - Material e Métodos). Não foram observados padrões claros em relação aos diferentes níveis de temperatura. No entanto, podemos observar que para a espécie *D. lineata* houve um predomínio nos tratamento de 22°C e 24°C dos tipos de *habitus* que representam um indivíduo alongado e bastante relaxado (*habitus* tipo 3 e 4 – Figura 22) em relação ao grupo de 26°C. Enquanto que para *Anemonia sargassensis* não foi detectada qualquer tendência para um determinado tipo de *habitus* nas temperaturas mais elevadas ou mais baixas (Figura 21).

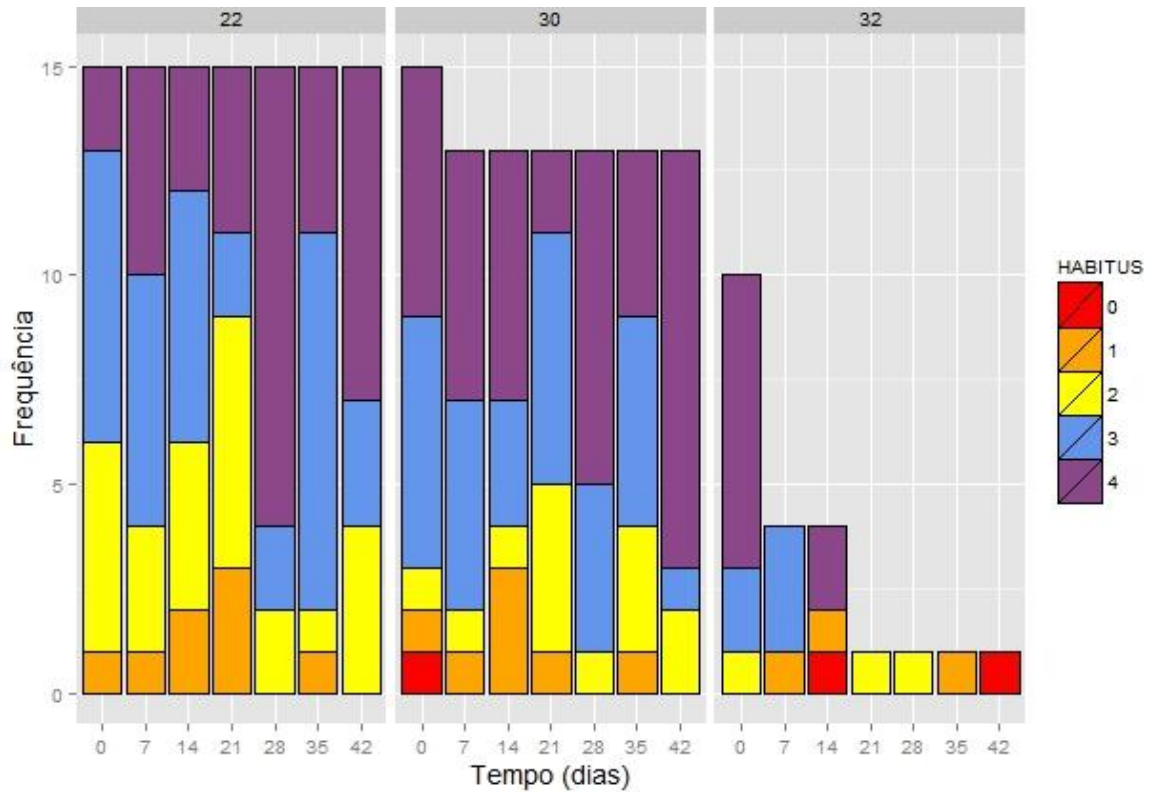


Figura 22 – *Habitus* de *A. sargassensis* nos diferentes grupos de temperatura

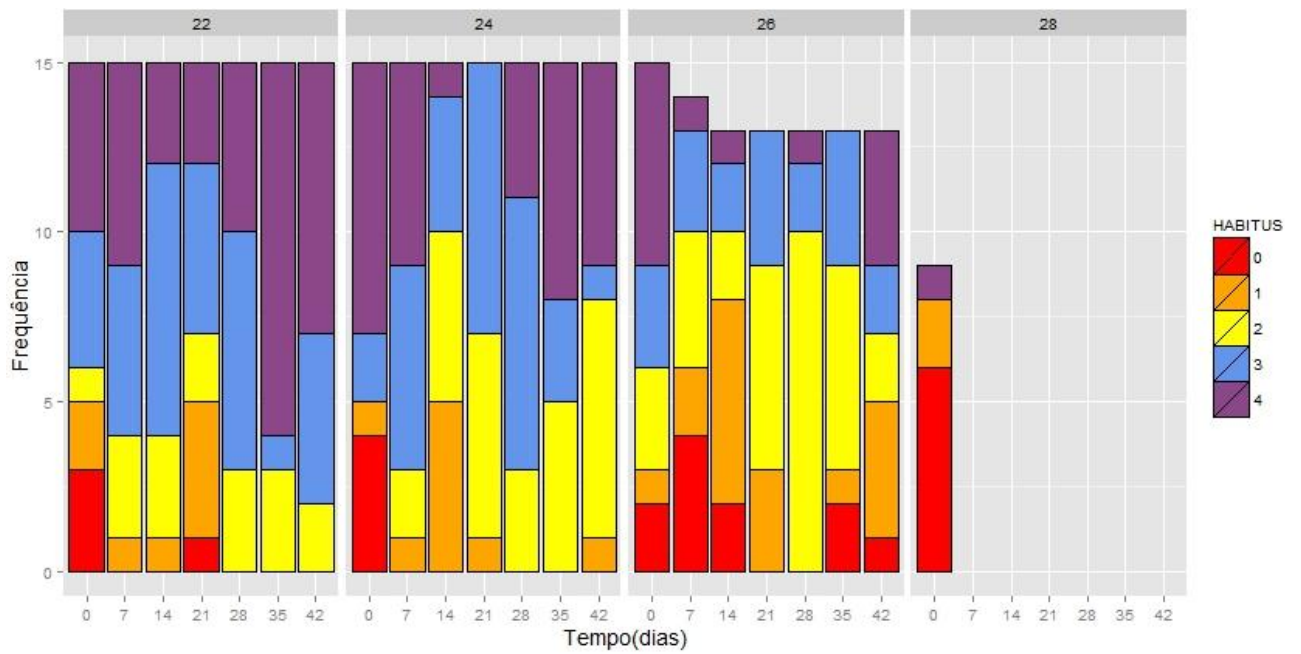


Figura 23 - *Habitus* de *D. lineata* nos diferentes grupos de temperatura

### **5.9. Reprodução assexuada**

O número de eventos de fissão foi contado durante todo o experimento (42 dias) nos diferentes tratamentos de temperatura. *A. sargassensis* não mostrou nenhuma fissão, o número de indivíduos permaneceu constante ou mesmo diminuiu em níveis de temperatura mais elevados (ver resultados de sobrevivência). *D. lineata* mostrou seis eventos de fissão no nível de temperatura mais baixo (22°C), três a 24°C e um a 26°C. Houve uma tendência de diminuição na reprodução assexuada conforme o aumento de temperatura.

### **5.10. Estresse térmico agudo**

Após cada evento de fissão, foi realizado um experimento de estresse térmico agudo com um dos indivíduos resultantes. Foi identificada a temperatura máxima que o animal pode suportar por meio de um aquecimento acelerado. Os dados do grupo de tratamento a 26°C foram excluídos devido à baixa replicação ( $n = 1$ ). A Figura 23 mostra a diferença da temperatura inicial de cada tratamento e da temperatura adicional em que os animais morreram. O aumento de temperatura média tolerável para indivíduos do grupo de 22°C ( $n=6$ ) foi de +5,4°C ( $\pm 1,6^\circ\text{C}$ ), para indivíduos do grupo de 24°C ( $n=3$ ) foi +6,7°C ( $\pm 2,3^\circ\text{C}$ ) e para indivíduos do grupo 26°C foi de +7,5°C. Não houve diferença significativa na tolerância de temperatura adicional entre os dois níveis de temperatura de 22°C e 24°C (Tabela 11). No entanto, observou-se que os animais aclimatados a temperaturas mais elevadas suportaram temperaturas adicionais maiores.

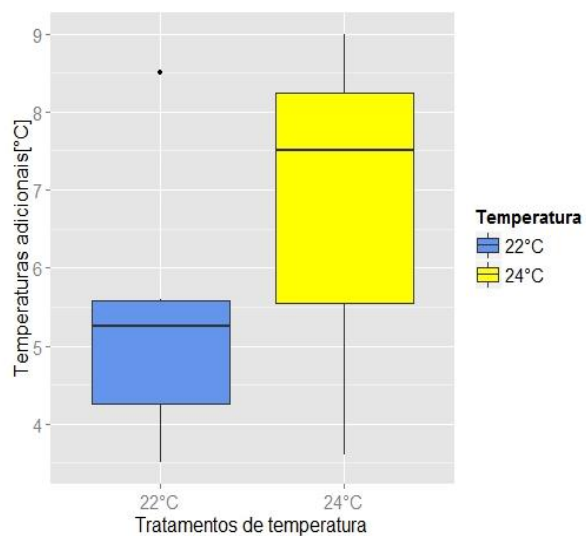


Figura 24 - Temperaturas adicionais suportadas pelos indivíduos de *D. lineata*

Tabela 11- Teste *t* com correção de Welch do experimento de estresse térmico agudo

	<b>Graus de liberdade</b>	<b><i>t</i></b>	<b><i>p</i></b>
<b>Tratamento</b>	6	<0,0001	0,1785

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Limite superior de tolerância térmica

A resposta de sobrevivência indicou o limite superior de tolerância térmica para cada espécie estudada. Como esclarecido nos resultados, consideramos o limite superior de tolerância térmica, a temperatura em que mais de 50 % das anêmonas da amostra tenha sobrevivido até o final do experimento. Diante desta definição, a temperatura máxima em que *A. sargassensis* sobreviveu durante os 42 dias de experimento foi de 30°C (8°C a mais do que a temperatura ambiente), enquanto que o limite máximo encontrado para *D. lineata* foi de 26°C (4°C a mais do que a temperatura ambiente).

Muitos autores relatam que a diferença no limite de tolerância térmica entre espécies poderia ser explicada de acordo com sua origem (nativa/exótica). Comumente, as espécies exóticas são relatadas como mais tolerantes ao calor do que as nativas (Dukes e Mooney, 1999, Bates *et al.*, 2013). *D. lineata* é uma espécie exótica, conhecida por ser amplamente euritérmica, o que é evidenciado tanto por sua faixa latitudinal de ocorrência quanto pela sua capacidade para sobreviver na região entremarés exposta às extremas condições de temperaturas (Johnson e Shick, 1977). Tais características levariam ao pressuposto de que essa espécie apresentaria um limite superior de tolerância térmica mais elevado. No entanto, de acordo com os resultados obtidos, a espécie nativa *A. sargassensis* possui um limite de tolerância térmica maior do que a espécie exótica, o oposto ao esperado.

Uma possível explicação para a maior vulnerabilidade térmica de *D. lineata* poderia ser dada pelo fato de que os indivíduos coletados eram clones, já que foram encontrados numa área submersa muito pequena devido à escassez da espécie ao longo da costa de Búzios. É cabível que a população investigada seja composta por clones descendentes de indivíduos adaptados a temperaturas mais frias. Somado à sua restrita variabilidade genética, isso resultaria em um baixo limite de tolerância a maiores temperaturas.

*D. lineata* é uma espécie cosmopolita e já foi muito comum na área do Rio de Janeiro há cerca de alguns anos (Pires, 1987). Ressaltamos que se a população desse antozoário, que anteriormente estava estabelecida na Baía de Guanabara, fosse descendente de indivíduos com uma menor tolerância ao calor, isso explicaria o baixo número de indivíduos encontrados atualmente, pois poderíamos considerar que devido ao aquecimento durante as últimas décadas, esses organismos estariam nos limites de sua tolerância ambiental, o que provavelmente resultou em uma elevada mortalidade dessa espécie. Com esta perspectiva, devido ao efeito gargalo de garrafa, a característica observada de um limite superior de tolerância térmica menor para *D. lineata* poderia estar relacionada com a herança dos primeiros indivíduos desta área, tendo em vista que esses indivíduos consistiriam de uma prole proveniente de um único colonizador.

Gollasch e Zúrneck (1996) apontam que populações de *D. lineata* parecem não ter sucesso em alguns locais principalmente devido às suas limitações resultantes da reprodução assexuada. Observaram que populações locais dessa espécie desapareceram repentinamente ou tornaram-se extremamente raras por consequência da estrutura da população ser monoclonal. Outros autores ressaltam que embora *D. lineata* seja uma espécie resistente para extremos de temperatura e salinidade, uma pequena mudança nessas condições pode levar a mortalidade massiva, considerando que o genótipo dos indivíduos presente é o mesmo. Sendo as populações normalmente compostas por um ou bem poucos clones, a suscetibilidade dessas espécies a extinções locais é compreensível e até mesmo esperada (Shick *et al.*, 1979, Shick, 1991). Nguyen *et al.* (2011), corroboram com esses estudos ao afirmarem que as espécies podem ser mais vulneráveis às mudanças na temperatura se a sua capacidade de adaptação através de mudanças na estrutura genética das populações for relativamente limitada. As respostas distintas entre os organismos podem refletir nas diferenças na história evolutiva e também associações filogenéticas entre as espécies. Nossos resultados mostram a complexidade das possíveis respostas ao estresse térmico. Possivelmente, o progresso das mudanças climáticas, em



conjunto com outros estressores ambientais, como a poluição ou uma flutuação natural no tamanho da população, podem ser responsáveis pela ocorrência reduzida de *D. lineata* nos dias atuais.

O quinto relatório de avaliação do IPCC prevê um aumento da temperatura da água superficial do oceano de 2°C na área costeira do estado do Rio de Janeiro até 2100 (IPCC, 2014). Caso este cenário esperado de aumento da temperatura da superfície dos oceanos venha a se confirmar como uma realidade, isso poderia afetar as espécies de anêmonas-do-mar deste estudo. O aumento previsto da temperatura da água de 22°C para 24°C até o final do século não ameaçaria as duas espécies localmente, tendo em vista que o limite superior de tolerância térmica encontrado para *A. sargassensis* foi de 30°C e para *D. lineata* de 26°C. Entretanto, a temperatura média a longo prazo de 22°C é a média da água do mar nos três meses de inverno (julho, agosto e setembro). No verão, foi observado para o mês de março uma temperatura média de 26°C. Se for considerado o mesmo limite superior de tolerância térmica para os animais aclimatados no verão, a temperatura prevista de verão de 28°C em 2100 excederia o limite de tolerância térmica de *D. lineata* em 2 graus. Esta espécie poderia ser extinta localmente, enquanto as populações de *A. sargassensis* persistiriam, uma vez que a temperatura média futura do verão de 28°C ainda está 2 graus abaixo do limite térmico tolerado por ela. No entanto, o limite térmico superior de ectotérmicos pode variar sazonalmente (Noakes *et al.*, 2016). Deste modo é esperado que este limite das anêmonas aclimatadas no verão seja maior em comparação com os animais aclimatados no inverno. Provavelmente, o limite superior de tolerância térmica no verão será maior que o limite identificado neste estudo. Para fazer previsões mais precisas, é necessário investigar a influência das mudanças sazonais no limite superior de tolerância térmica dos ectotérmicos marinhos.

Durante a fase de aclimação deste estudo, a velocidade do aquecimento foi relativamente rápida, com +2°C por dia. O aquecimento global natural dos oceanos é muito mais lento. Sabe-se que a velocidade do aquecimento tem uma grande influência no limite térmico superior (Stillman,

2003). Ectotérmicos que experimentaram um aquecimento mais lento e mais longo exibem um limite superior de tolerância térmica menor. Enquanto organismos que experimentaram um aquecimento em curto prazo e rápido sobrevivem a temperaturas mais elevadas (Peck *et al.*, 2009). Diante desse esclarecimento, é provável que a taxa de aquecimento lento decorrente das mudanças climáticas reduza o limite térmico superior para ambas as espécies deste estudo. Neste contexto, a diferença de apenas 2 graus entre o limite de tolerância térmica superior (30°C) para *A. sargassensis* e a temperatura prevista da água no verão (28°C) pode não ser suficiente para que esta espécie sobreviva.

Ambas as espécies estudadas pertencem à faixa equatorial. Como previsto por Stevens (1989), a flexibilidade fisiológica de organismos de regiões tropicais para lidar com flutuações de temperatura, é menor comparada aos organismos de latitudes temperadas. Foi possível comparar os nossos resultados de *D. lineata* com os limites superiores de tolerância térmica encontrados para a mesma espécie em diferentes latitudes. Na Indonésia (Bogor - latitude de 6,6°S), as anêmonas foram mantidas na temperatura ambiente de 27°C e o limite térmico encontrado foi de 36°C, 9°C a mais do que a temperatura ambiente (Hamm e Akna, 2015, não publicado). Esses organismos vivem em latitudes mais baixas comparados aos que tivemos em nosso estudo, presumia-se que por esta razão seriam os mais sensíveis ao estresse térmico (Stevens, 1989, Compton *et al.*, 2007; Deutsch *et al.*, 2008; Tewksbury *et al.*, 2008), no entanto o limite superior de tolerância térmica dos indivíduos de *D. lineata* coletados no Rio de Janeiro foi ainda menor (4°C a mais do que a temperatura ambiente). Como discutido anteriormente, a restrita variabilidade genética desses indivíduos pode ter contribuído para este resultado inesperado. No Japão (Akkeshi – latitude 43.3°), representando a maior latitude, o limite superior térmico para *D. lineata* foi de 33°C, 17°C a mais do que a temperatura ambiente (Yamaguchi e Schuller, 2015, não publicado). Neste caso, os resultados suportariam a hipótese de variabilidade climática (Stevens, 1989), a qual esclarece que espécies de latitudes temperadas

experimentam maior variação de temperatura, e assim é selecionada uma amplitude mais ampla de tolerância térmica.

Se *A. sargassensis* e *D. lineata* fossem localmente extintas, animais com uma tolerância térmica superior presumivelmente poderiam substituí-los. No entanto, tal mudança depende de diversos fatores como a disponibilidade de recursos, a interação predador-presa, equilíbrio da concorrência e, claro, os processos de adaptação evolutiva. Devido a esses padrões complexos, é muito difícil prever os efeitos das mudanças climáticas no ecossistema (Seney *et al.*, 2013 – ver Figura 25).

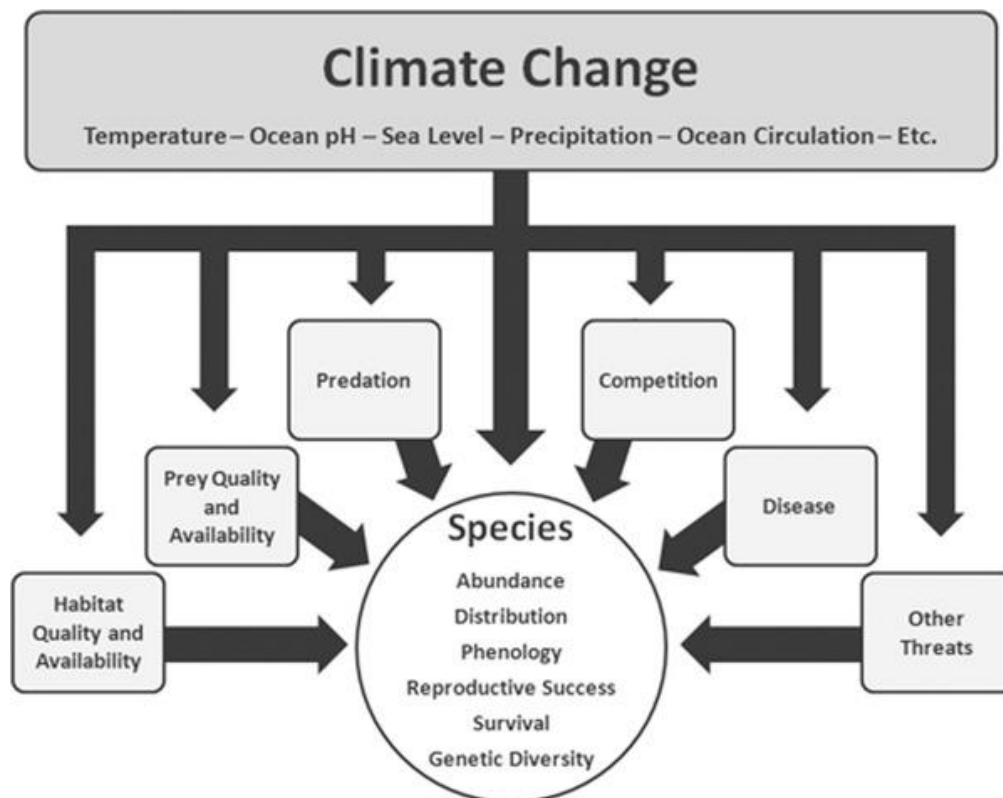


Figura 25 - Esquema simplificado das numerosas interações entre espécies, o ecossistema e os efeitos climáticos (embora não descritos, também ocorrem interações entre todos os componentes do ecossistema). Modificado de Seney *et al.* (2013).

Todos esses cenários discutidos aqui ainda são incertos e devem ser considerados em uma perspectiva de longo prazo. Como na maioria das ecorregiões marinhas do Brasil ainda existe uma carência relativa à aquisição contínua de dados, bem como de estudos ecológicos a longo prazo, a direção e a intensidade das mudanças, bem como as respostas das comunidades

biológicas às mudanças climáticas globais devem ser tomadas com cautela. Além disso, é de extrema importância um esforço para que haja um monitoramento rigoroso dos indicadores de estresse térmico para os organismos.

## 6.2. Biomassa

Estudos recentes evidenciam que temperaturas além da faixa de performance normal de um organismo, ao invés de morte induzida por aquecimento, podem resultar em alcance reduzido para o crescimento e reprodução (Pörtner e Knust, 2007; Wang e Overgaard, 2007).

Wang *et al.* (2013) observaram mudanças do peso corporal de pepinos-do-mar diante de diferentes temperaturas. Os autores verificaram que as taxas de crescimento foram dependentes da temperatura, *i.e.*, houve um declínio no peso dos animais com o aumento da mesma  $16^{\circ}\text{C} > 21^{\circ}\text{C} > 26^{\circ}\text{C}$ . Animais do tratamento de  $16^{\circ}\text{C}$  tiveram maior taxa de crescimento comparada aos tratamentos de maiores temperaturas. No estudo de Wang *et al.* (2015), os autores verificaram que a expressão de proteínas de choque térmico de pepinos-do-mar aumentou diante de temperaturas maiores. A expressão dessas proteínas é um processo que consome energia, portanto quando são suprarreguladas a demanda de energia celular pode aumentar drasticamente. Diante desses custos energéticos induzidos pelo estresse térmico, é reduzida a energia disponível para o crescimento (Somero, 2004).

Ao longo do experimento aqui apresentado, *D. lineata* obteve uma média positiva na temperatura ambiente (+0,04 g) e passou a ter uma biomassa negativa ( $26^{\circ}\text{C}$  média -0,01 g) com temperaturas crescentes dentro das seis semanas de experimento. *A. sargassensis* teve uma biomassa ligeiramente negativa a  $22^{\circ}\text{C}$  (média -0,13 g), a qual se tornou ainda menor (média -0,33 g a  $30^{\circ}\text{C}$ ) com o aumento das temperaturas.

A alta correlação (> 92% de variação explicada) obtida em nosso estudo entre a biomassa úmida e a biomassa seca revela que a biomassa úmida de anêmonas-do-mar é um estimador muito bom para a sua biomassa seca.

Como consequência, podemos afirmar que o método de biomassa úmida é confiável e recomendável para estudos adicionais com estes organismos.

Os mecanismos fisiológicos que estendem as janelas térmicas possuem um alto custo energético. Embora os ajustes à temperatura contribuam para a sobrevivência durante uma perturbação térmica, esse custo é cumprido à custa de outras funções críticas para os organismos como crescimento e reprodução (Hofmann e Togman, 2010). Era de se esperar uma biomassa reduzida a uma temperatura mais alta em comparação com a temperatura ambiente de 22°C, pois os animais submetidos a temperatura mais alta precisariam de energia para regular os processos fisiológicos e bioquímicos de combate ao calor (por exemplo, aumentar a expressão de proteínas de choque térmico) para manter as funções corporais necessárias. De acordo com isso, ambas as espécies deste estudo mostraram uma redução da biomassa com o aumento da temperatura da água (Figura 15). A biomassa reduzida das anêmonas-do-mar constitui uma evidência de estresse e mudança de energia para combater o calor.

Uma possível explicação para que *A. sargassensis* tenha reduzido o tecido, mesmo em temperaturas confortáveis, seria as condições de laboratório que podem ter causado um estresse desconhecido, o que contribuiria para a redução geral da biomassa úmida. A combinação de possíveis estressores do laboratório e do estresse térmico pode ter resultado em uma maior perda de biomassa úmida a temperaturas mais altas, como ocorreu no tratamento de 30°C. A dieta menos diversificada comparada ao que esses animais encontrariam na natureza poderia ser um desses estressores. Além disso, no momento de realizar as aferições de biomassa, foi difícil estabelecer um padrão de secagem dos indivíduos de *A. sargassensis*, pois mesmo que tenha sido realizado o mesmo procedimento, alguns indivíduos perdiam mais água enquanto outros retiveram mais, o que pode ter interferido um pouco nas medições.

### 6.3. Fixação e refixação

Era esperado que sob temperaturas mais elevadas os animais se desprenderiam do substrato de forma mais frequente ou então que levariam mais tempo para refixarem-se após um destacamento provocado. Diante de um estresse térmico, desprender-se e flutuar de acordo com as correntes pode ser uma boa estratégia para anêmonas alcançarem maiores distâncias (Rodríguez e López-gonzález, 2013) e ambientes mais estáveis. No entanto, para ambas as espécies estudadas, não houve diferença na fixação nem na refixação entre os tratamentos de temperatura.

### 6.4. Respiração

. *D. lineata* (média de 0,034 g  $\pm$  0,021 g) apresentou menos do que 10% da biomassa úmida (medida antes dos experimentos) de *A. sargassensis* (média de 0,544 g  $\pm$  0,282 g). O consumo de oxigênio de *D. lineata* foi provavelmente muito pequeno para causar uma mudança detectável na concentração de oxigênio e por isso não foi possível mensurar sua respiração. Dispositivos de medição com maior sensibilidade ou uma câmara de medição de menor volume de água poderiam ser úteis para detectar a respiração dessas anêmonas.

Uma maior taxa de respiração é o resultado de um maior requisito de energia. Diferentes tipos de processos como transporte de membrana, homeostase de células, organização de locomoção e processos de absorção precisam de mais energia se os animais lutam contra o estresse térmico (Peck *et al.*, 2009). Os resultados obtidos revelaram que o consumo de O<sub>2</sub> foi significativamente maior em temperaturas elevadas em todos os três dias para *A. sargassensis* (Tabela 7 - Resultados). As três taxas médias de respiração dos indivíduos a 22°C não diferiram entre os dias. Conseqüentemente, manter o animal durante seis semanas em condições de laboratório à temperatura ambiente não obteve impacto no seu consumo de oxigênio.

A taxa de respiração média mais alta foi de 6,6 mg O<sub>2</sub> / l / h / g de biomassa seca, medida para os indivíduos a 30°C no dia 0. A taxa de

respiração dos indivíduos a 30°C diminui com o tempo. No entanto, o consumo de oxigênio foi significativamente maior do que nos indivíduos a 22°C em todos os três dias. O declínio da taxa de respiração a 30°C com o tempo é presumivelmente uma indicação de um processo de aclimatação. Anêmonas-do-mar e outros ectotérmicos marinhos podem evoluir respostas adaptativas ao estresse térmico (por exemplo, *upregulated* de proteínas de choque térmico) dentro de 3 dias (Narum *et al.*, 2013).

### **6.5. Motilidade**

Esperava-se que as anêmonas apresentassem maior motilidade sob temperaturas mais elevadas, como tentativa de escapar para um ambiente mais frio (Peck *et al.*, 2009). No entanto, *A. sargassensis* e *D. lineata* não mostraram nenhuma mudança significativa em seu comportamento em maiores temperaturas.

### **6.6. Reexpansão**

Foi verificado para outros ectotérmicos marinhos que o estresse térmico pode tornar mais lentas algumas respostas comportamentais. Como revela o estudo de Morley *et al.* (2012), mariscos e estrelas-do-mar enterram-se mais lentamente sob o aumento de temperaturas.

A contração total do corpo é uma posição protetora para minimizar os danos sobre a superfície das anêmonas. No entanto, elas precisam expandir-se novamente para capturar seu alimento. Esperava-se que regimes de temperaturas mais altas também influenciariam na reação de reexpansão dos tentáculos desses organismos. No entanto, as medidas obtidas neste estudo não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos de temperatura para ambas as espécies. Uma possível razão para que nenhum efeito fosse observado nessa resposta pode ter sido o tipo de estímulo que iniciou a contração dos animais, por ser muito fraco ou inadequado, não configurou-se como um bom indicador de estresse térmico para as anêmonas-do-mar.

### **6.7. *Habitus***

A contração é uma postura protetora para as anêmonas-do-mar (Edmunds, *et al.*, 2009, Mc Farlane, *et al.*, 1993), portanto, um comportamento de retração aumentado deveria ser observado sob temperaturas mais elevadas. Este estudo não conseguiu detectar nenhum padrão na mudança de postura em diferentes tratamentos de temperatura. Para estressores, como salinidade, a contração do corpo parece ser uma resposta de proteção eficaz. Consequentemente, as anêmonas-do-mar permanecem mais fechadas sob o estresse de baixa salinidade do que no ambiente de salinidade normal (Podbielski *et al.*, 2016). A contração dos tentáculos e da coluna do corpo não foi observada como meio de evitar o estresse por calor, o *habitus* não representou um bom indicador de estresse térmico.

### **6.8. Reprodução assexuada**

Na maior temperatura tolerável, 26°C para *D. lineata* e 32°C para *A. sargassensis*, esperava-se que a reprodução assexuada fosse reduzida em relação ao grupo controle (22°C). Estudos anteriores mostraram que, com o aumento das temperaturas, a taxa de fissão das anêmonas-do-mar aumenta de início até diminuir repentinamente (Johnson e Shick, 1977, Minasian, 1979). Neste estudo, não há diferença detectável na taxa de fissão entre os tratamentos de temperatura para ambas as espécies. *A. sargassensis* não sofreu nenhuma fissão até o fim do experimento. Nenhum evento de fissão detectado e os resultados da variável de resposta “biomassa” suportam a hipótese de que as condições de laboratório podem ter causado um estresse não identificado para *A. sargassensis*, influenciando assim nos resultados.

*D. lineata* realizou eventos de fissão, mas não exibiu efeitos significativos quanto às diferenças de temperatura. No entanto, houve uma tendência de diminuição da reprodução sexuada com o aumento da temperatura. A 22°C ocorreram seis eventos de fissão, três a 24°C, e um único evento de fissão dentro de seis semanas a 26 °C. Um estresse térmico constante pode, portanto reduzir a reprodução assexuada nesta espécie. Assim, o aquecimento global



poderia ter uma forte influência sobre o tamanho da população, mesmo sem exceder o limite de temperatura térmica superior destas anêmonas-do-mar. O que também justificaria o baixo número de indivíduos de *D. lineata* encontrados atualmente na Baía de Guanabara.

### **6.9. Estresse térmico agudo**

Este tipo de estresse seria similar a uma onda de calor súbita e extrema. Juntamente com o aumento geral da temperatura, prevê-se que os eventos climáticos extremos ocorram mais frequentemente (IPCC, 2014). De acordo com Peck *et al.*, (2009) o estresse térmico é maior para os animais mais aclimatados. Organismos a 22°C experimentaram um aquecimento em curto prazo e rápido em relação aos de 24°C, que já estavam aclimatados a +2°C por 42 dias, o que segundo a literatura, levaria a uma tolerância reduzida em relação a estresse térmico adicional (Peck *et al.*, 2009). No entanto, a tendência observada foi contrária às expectativas: as anêmonas deste estudo, com uma maior temperatura de aclimação, suportaram melhor um aumento adicional de temperatura, comparadas às com menor aclimação. Devido à replicação relativamente baixa (n = 3 a 6, dependendo da temperatura), estudos com maior número de réplicas são necessários para conclusões mais sólidas.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É impossível prever o nível de risco mecânico ou fisiológico ao qual um organismo é susceptível de ser submetido sem antes quantificar a magnitude do estressor ambiental e a capacidade do organismo de resistir à condição em questão. Neste estudo, determinamos o limite de tolerância térmica superior de dois animais ectotérmicos marinhos que vivem em um clima tropical, e por estas circunstâncias são designados mais sensíveis às mudanças de temperatura. Além disso, foram discutidas e propostas diferentes variáveis de resposta na tentativa de monitorar os sinais de estresse térmico das anêmonas-do-mar, o que ajudaria a documentar mudanças e identificar os efeitos desse estressor. Constatamos que algumas variáveis de resposta mostraram resultados diferentes para as duas espécies ou só puderam ser investigadas para uma espécie. São variáveis com potencial para ser um indicador de estresse térmico, que podem ser modificadas ou desenvolvidas para funcionar como um indicador de estresse térmico para anêmonas-do-mar em geral.

A comparação da tolerância térmica entre as duas espécies estudadas pode fornecer uma aproximação de primeira ordem dos impactos das mudanças climáticas sobre estes organismos. No entanto, é apropriado lembrar que, como os resultados dependem da identificação de limiares fisiológicos e interações com outros fatores ecológicos, tais respostas devem ser influenciadas pela incerteza e simplificações. Os limites de tolerância térmica de uma determinada espécie podem depender de sua história biológica, mudanças em diferentes áreas, exibir variabilidade individual e ser tendenciosas pelas condições experimentais em que foram determinadas.

Devido aos nossos dados serem consistentes com tolerância de temperatura, estudos de proteínas de choque térmico seriam particularmente informativos. Essas proteínas têm sido estudadas em vários organismos, incluindo espécies marinhas, onde sua expressão é fortemente relacionada com o estresse induzido por temperatura. Estudos futuros voltados para mecanismos moleculares baseados na sensibilidade e performance fisiológica

ajudarão a entender melhor a adaptação local para variações de temperatura ambiental.

Diante de tanta complexidade, ressaltamos que de fato é importante gerar conjuntos de dados significativos e monitorar da melhor forma possível, principalmente os litorais vulneráveis ou sensíveis, a fim de prevenir ou minimizar os danos que as mudanças climáticas podem causar. Estudos fisiológicos que investiguem o limite de tolerância térmica entre as espécies são imprescindíveis para contribuir na previsão de efeitos das mudanças climáticas, através da determinação de quais espécies vivem atualmente mais próximas dos seus limites de tolerância térmica superior, quais sistemas fisiológicos definem esses limites e como as espécies diferem em capacidades de aclimação para modificar suas tolerâncias térmicas (Convey, 2001, Walther *et al.*, 2002, Somero, 2010, Nguyen *et al.*, 2011).

## REFERÊNCIAS

ARVEDLUND, M. Juvenile *Thalassoma amblycephalum* Bleeker (Labridae, Teleostei) dwelling among the tentacles of sea anemones: A cleanerfish with an unusual client? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 329, 61–173. 2006.

ATODA, K. Pedal laceration of the sea anemone, *Haliplanella luciae*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53, 299–313. 1973.

AYRE, D. The sea anemone *Actinia tenebrosa*: an opportunistic insectivore. *Ophelia*, 23, 149-153. 1984.

BANNERMAN, J., GILLESPIE, D., ROITBER, B. The impacts of extreme and fluctuating temperatures on trait-mediated indirect aphid–parasitoid interactions. *Ecological Entomology*, 36, 490–498. 2011.

BARNES, D., PECK, L., MORLEY, S. Ecological relevance of laboratory determined temperature limits: colonization potential, biogeography and resilience of Antarctic invertebrates to environmental change. *Global Change Biology*, 16, 3164–3169. 2010.

BATES, A. The intertidal distribution of two algal symbionts hosted by *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt 1835). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249, 249–262. 2000.

BATES, A., MCKELVIE, C., SORTE, C., MORLEY, S., JONES, N., MONDON, J., BIRD, T., QUINN, G. Geographical range, heat tolerance and invasion success in aquatic species. *Proceedings of the Royal Society B*, 280, 1–8. 2013.

BEAUMONT, L.J., PITMAN, A., PERKINS, S., ZIMMERMANN, N.E., YOCCOZ, N.G., THUILLER, W., Impacts of climate change on the world's most exceptional ecoregions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2306- 2311. 2011.

- BEERE, H. 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, 117, 2641-265. 2004.
- BELÉM, M., MONTEIRO, D. Contribuições ao conhecimento da fauna de Cnidários do Rio de Janeiro. II. *Haliplanella luciae* (Verrill, 1898) (Actiniaria, Acontinaria), uma nova ocorrência no Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, São Paulo, 26, 1-19.1977.
- BERNARDINO, A., NETTO, S., PAGLIOSA, P., BARROS, F., CHRISTOFOLETTI, R., ROSA-FILHO, J., COLLING, J., LANA, P. Predicting ecological changes on benthic estuarine assemblages through decadal climate trends along Brazilian marine ecoregions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 166, 74 – 82. 2015.
- BORGES, P., COSTA, A., CUNHA, R., GABRIEL, R., GONÇALVES, V., MARTINS, A., VIEIRA, V. Listagem dos organismos terrestres e marinhos dos Açores. OEIRAS, Príncipeia. 432. 2010.
- BOZINOVIC, F., BASTÍAS, D., BOHER, F., CLAVIJO-BAQUET, S., ESTAY, S., ANGILLETTA, M. The mean and variance of environmental temperature interact to determine physiological tolerance and fitness. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84, 543–552. 2011.
- BOZINOVIC, F., PÖRTNER, H. Physiological ecology meets climate change. *Ecology and Evolution*, 5, 1025–1030. 2015.
- BROWN, A., THATJE, S. The effects of changing climate on faunal depth distributions determine winners and losers. *Global Change Biology*, 21, 173–80. 2015.
- BRUSCA, R., G. BRUSCA. *Invertebrados*. 2ª ed. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 968. 2007.
- CARLGREN, O. A survey of the Ptychodactiaria, Corallimorpharia and Actiniaria. *Kungl. Sv. Vet. Hand.*1, 1–120.1949.

CAVOLE, L., DEMKO, R., DINER, A., GIDDINGS, I., KOESTER, C., PAGNIELLO, M., PAULSEN, A., RAMIREZ-VALDEZ, S., SCHWENCK, N. Biological impacts of the 2013–2015 warm-water anomaly in the Northeast Pacific: Winners, losers, and the future. *Oceanography*, 29, 273–285. 2016.

CHIA, F. Sea anemone reproduction: patterns and adaptative radiations. In: *Coelenterate Ecology and Behavior*. Mackie Plenum Press. 206-270. 1976.

CHINTIROGLOU, C., KOUKOURAS, A. The feeding habits of three Mediterranean sea anemone species, *Anemonia viridis* (Forsk.) , *Actinia equina* (Linnaeus) and *Cereus pedunculatus* (Pennant). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 46, 53–68. 1992.

COMA, R., RIBES, M., Serrano, E., JIMÉNEZ, E., SALAT, J., PASCUAL, J. Global warming-enhanced stratification and mass mortality events in the Mediterranean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 6176–6181. 2009.

COMPTON, T., RIJKENBERG, M., CRENT, J., PIERSMA, T. Thermal tolerance and climate variability: a comparison between bivalves from differing climates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 352, 200–211. 2007.

CONVEY, P. "Fingerprints" of Climate Change Adapted Behaviour and Shifting Species Ranges. Eds Walther, G., Burga, C., Edwards, 17-42. Kluwer Academic, New York. 2001.

CORRÊA, D. Corallimorpharia e Actiniaria do Atlântico Oeste Tropical. São Paulo, Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. 179. 1964.

CORREIA, M. Comunidades incrustrantes e a fauna associada em painéis experimentais na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. 236 p. Dissertação de Mestrado – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1989.

CREAGH, E., SHEEHAN, D., COTTER, T. Heat shock proteins – modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia* 14, 1161-1173. 2000.

CULUMBER, Z., MONKS, S. Resilience to extreme temperature events: acclimation capacity and body condition of a polymorphic fish in response to thermal stress. *Biological Journal of the Linnean Society*, 111, 504–510. 2014.

DALY, M., FAUTIN, D., CAPPOLA, V. Systematics of the Hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 139, 419-437. 2003.

DERECZYNSKI, C., SILVA, W., MARENGO J. Detection and projections of climate change in Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal of Climate Change*, 2, 25-33. 2013.

DEUTSCH, C., TEWKSBURY J., HUEY R., SHELDON K., GHALAMBOR C., HAAK D., MARTIN., P. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105, 6668–6672. 2008.

DONELSON, J., MUNDAY, P., MCCORMICK, M., NILSSON, G. Acclimation to predicted ocean warming through developmental plasticity in a tropical reef fish. *Global Change Biology*, 17, 1712–171. 2011.

DONEY, S., RUCKELSHAUS, M., DUFFY, J., BARRY, J., CHAN F., ENGLISH C. Climate change impacts on marine ecosystems. *Annual Review of Marine Science* 4:11–37. 2012.

DUKES J., MOONEY, H. Does global change increase the success of biological invaders? *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 135-139, 1999.

DUNN, D. The clownfish sea anemones: Stichodactylidae (Coelenterata: Actiniaria) and other sea anemones symbiotic with pomacentrid fishes. *Transactions of the American Philosophical Society*, 71, 1981.

EDMUNDS, M., POTTS, G. W., SWINFEN, R. C., WATERS, V. L. Defensive behaviour of sea anemones in response to predation by the opisthobranch

mollusc *Aeolidia papillosa* (L.). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 56, 65. 2009.

EDWARDS, M., RICHARDSON, A. Impact of climate change on marine pelagic phenology and trophic mismatch. Nature, 430, 881 – 884. 2004.

ELLIS, V, ROSS, D., SUTTON, L. The pedal disc of the swimming sea anemone *Stomphia coccinea* during detachment, swimming and resettlement. Canadian Journal of Zoology, 47, 333-342. 1969.

FAUTIN, D. Hexacorallians of the World. World Register of Marine Species. 2011.

FAUTIN, D. Reproduction of Cnidaria. Canadian Journal of Zoology, 80, 1735-1754. 2002.

FAUTIN, D., MARISCAL, R. Cnidaria: Anthozoa. In: HARRISON, F., WESTFALL, J.A (eds). Microscopic anatomy of invertebrates, Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Vol II. New York: Wiley, p. 267–358. 1991.

FELDER, D., CAMP, D. Gulf of Mexico Origin, Waters, and Biota. Texas A&M University Press, 1. 2009.

FULLER, P. *Haliplanella lineata*. USGS non indigenous aquatic species database, Gainesville, FL. 2007.

GALLI, G., SOLIDORO, C., LOVATO, T. Marine Heat Waves Hazard 3D Maps and the risk for low motility organisms in a Warming Mediterranean Sea. Frontiers in Marine Science, 2296-7745. 2017.

GLANTZ, M. H. Assessing the impacts of climate: The issue of winners and losers in a global climate change context. In Zwerver, S., van Rompaey, R.S.A.R., Kok, M.T.J. and Berk, M.M. (eds.) Climate Change Research: Evaluation and Policy Implications. Elsevier Science: Amsterdam, 41–54. 1995.

GLYNN, P. Coral reef bleaching in the 1980s and possible connections with global warming. Trends in Ecology & Evolution. 6, 17-179. 1991.



GLYNN, P., DE WEERDT, W. Elimination of two reef-building hydrocorals following the 1982–83 El Niño warming event. *Science*, 253, 69–71. 1991.

GOLLASCH, S., ZÜRNECK, K. Transoceanic dispersal of benthic macrofauna: *Haliplanella luciae* (Verrill, 1898) (Anthozoa, Actiniaria) found on a ship's hull in a shipyard dock in Hamburg Harbour, Germany. *50*: 253-258. 1996.

GRASSHOFF, K., KREMLING, K., EHRHARDT, M. Methods of seawater analysis. *Marine Chemistry*. 7, 86-87. 1999.

HAND, C. Behavior of some New Zealand sea anemones and their molluscan and crustacean hosts. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 9, 509-527. 1975.

HARE, J., MORRISON, W., NELSON, M., STACHURA, M., TEETERS, E., GRIFFIS, R. A vulnerability assessment of fish and invertebrates to climate change on the Northeast U.S. Continental Shelf. *PLoS ONE*, 11, 0146756. 2016.

HARLAND, A., DAVIES, P. Stimulation of respiration and photosynthesis by light in the symbiotic anemone *Anemonia viridis* (Forsk., 1775) (Anthozoa: Actiniaria). In: *Proceedings of the 6th International Conference on Coelenterate Biology*. 233-238. 1997.

HARLEY C., HUGHES, A., HULTGREN, K., MINER, B., SORTE, C., THORNBUR, C. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9, 228–41. 2006.

HARRIS, G. 1991. Comparative ecology of subtidal actinarians from the coasts of California and the Gulf of Maine, USA. In: *IV. Ecology Zoanthids, corals and sea anemones*. Springer Netherlands. *Proceedings. Hydrobiologia Publisher*. v. 1. p. 271–278. 1991.

HARTOG, J. The genus *Telmatactis* Gravier, 1916 (Actiniaria: Acontiaria: Isophelliidae) in Greece and the eastern Mediterranean. *Zoologische Mededelingen Leiden*, 1916, 91–92. 1995.

HARVELL, C., MITCHELL, C., WARD J., ALTIZER, S., DOBSON, A., OSTFELD, R., SAMUEL, M. Climate warming and disease Risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296, 2158–62. 2002.

HOCHACHKA P., SOMERO G. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York. 2002.

HOEGH-GULDBERG, O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Ecosystems*, 50, 1999.

HOFFMANN, A., SGRO, C. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470, 79–48. 2011.

HOFMANN, G., TODGHAM, A. Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annual Review of Physiology*, 72, 127-145. 2010.

HOUTMAN, R., Paul, L., UNGEMACH, R., YDENBERG, R. Feeding and predator-avoidance by the rose anemone *Urticina piscivora*. *Marine Biology*, 128, 225-229. 1997.

IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate Change 2014 Synthesis Report Summary Chapter for Policymakers. 2014.

JENTSCH, A., KREYLING, J., BEIERKUHNLIN, C. A new generation of climate-change experiments: events, not trends. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5, 365–374. 2007.

JOHNSON, L., SHICK, J. Effects of fluctuating temperature and immersion on asexual reproduction in the intertidal sea anemone *Haliplanella luciae* (Verrill) in laboratory culture, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 28, 141–149. 1977.

MANUEL, R. The Anthozoa. London: Academic Press Inc., 241.1981.

MARENGO, J. Climate change, extreme weather and climate events in Brazil. 4–19. *American Journal of Climate Change*, 25-33. 2009.

- MARENGO, J. Vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima no semi-árido do Brasil. *Parcerias estratégicas*, 27, 149-75, 2008.
- MARISCAL, R. Nature of symbiosis between Indo-Pacific anemones fishes and sea anemones. *Marine Biology*, 6, 58. 1970.
- MARQUES, A., COLLINS, A. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology*, 123, 23-42. 2004.
- MATHIESON, A., PENNIMAN, E., HARRIS, L. Northwest Atlantic Rocky Shore Ecology. In: MATHIESON, A.C.; NIEHUIS, P.H. (eds.) *Ecosystems of the World* 24. Amsterdam: Elsevier. p.109-191. 1991.
- MCFARLANE, I. D., HUDMAN, D., NOTHACKER, H.P., GRIMMELIKHUIJZEN, C. J. P. The expansion behaviour of sea anemones may be coordinated by two Inhibitory neuropeptides, anthoKAamide and antho-rlamide. *Biological Sciences*, 253, 183–188. 1993.
- MC MURRICH, J. Notes on the systematic position and distribution of the actinian *Sagartia luciae*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 2, 729–739. 1921.
- MCGREGOR, G., NIEUWOLT, S. *Tropical Climatology. An Introduction to the Climates of the Low Latitudes*. Wiley, New York, pp. 339. 1998.
- MIGOTTO, A., SILVEIRA, F., SCHLENZ, E., FREITAS, J. Cnidaria. In: *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*, 3: Invertebrados Marinhos. São Paulo: FAPESP. p. 310. 1999.
- MINASIAN. Characteristics of Asexual Reproduction in the Sea Anemone, *Haliplanella luciae* (Verrill), Reared in the Laboratory. Florida: *Coelenterate Ecology and Behavior*. 1976.
- MINASIAN, L. L. The effect of exogenous factors on morphology and asexual reproduction in laboratory cultures of the intertidal sea anemone, *Haliplanella*

*luciae* (Verrill) (Anthozoa: Actiniaria) from Delaware. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 40, 235–246. 1979.

MINCHIN, D. Predation on young *Pecten maximus* (L.) (Bivalvia), by the anemone *Anthopleura balii* (Cocks). Journal of Molluscan Studies, 49, 228-231. 1983.

MORLEY, S., HIRSE, T., PÖRTNER, H., PECK, L. Geographic variation in thermal tolerance within Southern Ocean marine ectotherms. Comparative Biochemistry and Physiology A, 153, 154–161. 2009.

MORLEY, S. A., Martin, S. M., BATES, A. E., CLARK, M. S., ERICSON, J., LAMARE, M., PECK, L. S. Spatial and temporal variation in the heat tolerance limits of two abundant Southern Ocean invertebrates. Marine Ecology Progress Series, 450, 81–92. 2012.

NARUM, S. R., CAMPBELL, N. R., MEYER, K. A., MILLER, M. R., HARDY, R. W. Thermal adaptation and acclimation of ectotherms from differing aquatic climates. Molecular Ecology, 22, 3090–3097. 2013.

NGUYEN, K., MORLEY, S., LAI, C., CLARK, M., TAN, K., BATES, A., PECK, L. Upper temperature limits of tropical marine ectotherms: global warming implications. PLoS One 6, 6–13. 2011.

NOAKES, M., WOLF, B., MCKECHNIE, A. Seasonal and geographical variation in heat tolerance and evaporative cooling capacity in a passerine bird. Journal of Experimental Biology, 219, 859-69, 2016.

NOGUEIRA JR, M, ROBERT, M, HADDAD, M. *Calliactis tricolor* (Anthozoa Acontiaria) epibionte em *Brachyura* (Crustacea, Decapoda) no litoral sul do Paraná e Norte de Santa Catarina. Acta Biologica Paranaense, 35, 233-248. 2006.

OCAÑA O., MORO L., ORTEA J., ESPINOSA J., CABALLER M. Guía visual de la biodiversidad marina de Guanahacabibes. I–Anémonas (Anthozoa:

Actiniaria, Corallimorpharia, Ceriantharia y Zoanthidea) *Avicennia*, 19, 133-142. 2007.

OTTAWAY, J. Population Ecology of the intertidal Anemone *Actinia tenebrosa* I. Pedal locomotion and Intraspecific aggression. *Australian Journal of Marine Freshwater*, 29, 787-802. 1978.

OTTAWAY, J. Some effects of temperature, desiccation and light on the intertidal anemone *Actinia tenebrosa* Farquhar (Cnidaria: Anthozoa). *Australian Journal of Marine Freshwater*, 24, 103-126. 1973.

PARMESAN, C. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual of Ecology, Evolution and Systematics*, 37, 637–669. 2006.

PECK, L., CLARK, M., MORLEY, S., MASSEY, A., ROSSETTI, H. Animal temperature limits and ecological relevance: Effects of size, activity and rates of change. *Functional Ecology*, 23, 248–256. 2009.

PECK, L., MORLEY, S., RICHARD, J., CLARK, M. Acclimation and thermal tolerance in Antarctic marine ectotherms. *Journal of Experimental Biology* 217, 16–22. 2014.

PIRES, D. O. Estudo Sistemático de Duas Espécies de Acontiaría (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação. Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. 1987.

PODBIELSKI, I., BOCK, C., LENZ, M., MELZNER, F. Using the critical salinity (Scrit) concept to predict invasion potential of the anemone *Diadumene lineata* in the Baltic Sea. *Marine Biology*, 163, 1-15. 2016.

POLOCZANSKA, E., BURROWS, M., BROWN, C., MOLINOS, J., HALPERN, B., HOEGH-GULDBERG, O. Responses of marine organisms to climate change across oceans. *Frontiers in Marine Sciences* 3, 1–21. 2016.

PÖRTNER, H. Physiological basis of temperature dependent biogeography: tradeoffs in muscle design and performance in polar ectotherms. *Journal of Experimental Biology*, 205, 2217–2230, 2002.

PÖRTNER, H., KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315, 95–97. 2007.

RAMOS DA SILVA, R., HASS, R. Ocean Global Warming Impacts on the South America Climate, *Frontiers in Earth Science*, 4, 2016.

REITZEL, A., CHU, T., EDQUIST, S., GENOVESE, C. Physiological and developmental responses to temperature by the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Marine Ecology Progress Series*, 484, 115–130. 2013.

RODRÍGUEZ, E. e López-gonzález, P. J. New records of Antarctic and Sub-Antarctic sea anemones (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria and Corallimorpharia) from the Weddell Sea, Antarctic Peninsula, and Scotia Arc. *Zootaxa*, 3624, 2–5. 2013.

ROSS, S. The Behavior of pagurids in symbiotic associations with actinians in Japan. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory XXII*, 22, 157-170. 1975.

ROSS, S., ZAMPONI, M. A symbiosis between *Paracalliactis mediterranea* n. sp. (Anthozoa-Actiniaria) and *Pagurus variabilis* A. Milne-Edwards and Bouvier. *Vie Milieu*, 32, 175-181. 1982.

SEMENIUK, V. Predicted response of coastal wetlands to climate changes: a Western Australian model. *Hydrobiologia*, 708, 23-43. 2013.

SENEY, E., ROWLAND, M., LOWERY, R., GRIFFIS, R., MC CLURE, M. Climate Change, Marine Environments, and the U.S. Endangered Species Act. *Conservation Biology*, 27, 1138–1146. 2013.

SHAPIRO, S., WILK, B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591–611. 1965.

SHERMAN, C., PEUCKER, A., AYRE, D. Do reproductive tactics vary with habitat heterogeneity in the intertidal sea anemone *Actinia tenebrosa*? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340, 259–267. 2007.

SHICK, J. Ecological Physiology and Genetics of the colonizing Actinian *Haliplanella luciae*. In Mackie, G. O. (Ed.): *Coelenterate Ecology and Behavior*, Plenum Press, New York, 137-146. 1976.

SHICK, J. *A functional biology of sea anemones*. Chapman and Hall, London. 1991.

SHICK, J., DOWSE H. Genetic basis of physiological variation in natural populations of sea anemones: intra and interclonal analyses of variance. In: Gibbs PE (ed) *Proc 19th Eur Mar Biol Symp Plymouth*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 465–179. 1985.

SHICK, J., HOFFMANN, R., LAMB, A. Asexual reproduction, population structure, and genotype-environment interactions in sea anemones. *American Zoologist*, 19, 699–713. 1979.

SILVA, R., HAAS R. Ocean Global Warming Impacts on the South America Climate. *Frontiers in Earth Science*, 4, 2016.

SNECDECOR, G., COCHRAN, G. *Statistical Methods* (Vol. 276). Wiley, Iowa State. University Press. 1991.

SOARES-GOMES, A., da GAMA, B.A.P., BAPTISTA NETO, J.A., FREIRE, D.G., CORDEIRO, R.C., MACHADO, W., BERNARDES, M.C., COUTINHO, R., THOMPSON, F.L., PEREIRA, R.C. *An Environmental Overview of Guanabara Bay*, Rio de Janeiro. *Regional Studies in Marine Science*. 2016.

SOMERO, G. Temperature adaptation of proteins: searching for basic “strategies”. *Comp. Biochem. Physiol.* 139, 321-333. 2004.

SOMERO, G. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers.” *Journal of Experimental Biology*, 213, 912–920. 2010.

SOMERO, G. Comparative physiology: a 'crystal ball' for predicting consequences of global change. *American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302, R1–R14. 2011.

SOMERO, G. The physiology of global change: linking patterns to mechanisms. *Annual Review of Marine Science*, 4, 9–6. 2012.

STACHOWICZ, J., TERWIN, J., WHITLATCH, R., OSMAN, R. Linking climate change and biological invasions: Ocean warming facilitates non indigenous species invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15497–15500. 2002.

STEPHENSON, T. *The British Sea Anemone*. London: The Ray Society. 1928.

STEVENS, G. The latitudinal gradient in geographical range: how so many species coexist in the tropics. *American Naturalist*, 133, 240–256. 1989.

STILLMAN, J. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science*, 301, 65–65. 2003.

STOCK, C., ALEXANDER, M., BOND, N., BRANDER, K., CHEUNG, W., CURCHITSER, E., DELWORTH, T. On the use of IPCC-class models to assess the impact of climate on living marine resources. *Progress in Oceanography*, 88, 1–27. 2011.

STUART-SMITH, R., EDGAR, G., BARRETT, N., KININMONTH, S., BATES, A. Thermal biases and vulnerability to warming in the world's marine fauna. *Nature* 528, 88–92. 2015.

TEWKSBURY, J., HUEY, R., DEUTSCH, C. Putting the heat on tropical animals. *Science*, 320, 1296–1297. 2008.

THOMPSON, R., BERADALL, J., BERINGER, J., GRACE, M., SARDINA, P. Means and extremes: building variability into community-level climate change experiments. *Ecology Letters*, 16, 799–806. 2013.



- TOMANEK, L. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81, 709–17. 2008.
- VAZQUEZ, D., GIANOLI, E., MORRIS, W., BOZINOVIC, F. Evolutionary and ecological impacts of increased climatic variability. *Biological Reviews*, 92, 22–42. 2015.
- VIDOLIN, D. Tolerância de variação a parâmetros ambientais e sua influência sobre a distribuição espacial de anêmonas do mar na zona entremarés de um costão rochoso no sul do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba. 2007.
- WALTHER, G., POST, E., CONVEY, P., MENZEL, A., PARMESAN, C., BEEBEE, T., FROMENTIN, J., HOEGH-GULDBERG, O., BAIRLEIN, F. Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416, 389–395. 2002.
- WANG, Q., DONG, Y., QIN, C., YU, S., DONG, S., WANG, F. Effects of rearing temperature on growth, metabolism and thermal tolerance of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: critical thermal maximum (CT<sub>max</sub>) and hsp90 gene expression. *Aquaculture Research*, 44, 1550–1559. 2013.
- WANG, Q., YU, S., DONG, Y. Parental effect of long acclimatization on thermal tolerance of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *PLoS ONE*, 10. 2015.
- WANG, T., OVERGAARD, J. The heartbreak of adapting to global warming. *Science*, 315, 49–50. 2007.
- WATERS, C., ZALASIEWICZ, J., SUMMERHAYES, C., BARNOSKY, A., POIRIER, C., GAŁUSZKA, A. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. *Science*, 351, 137–147. 2016.
- WILLIAMS, R. Are there physiological races of the sea anemone *Diadumene luciae*? *Marine Biology*, 21, 327–330. 1973.

ZAMER, W., MCMANUS, M., ROWELL, C. Physiological variation in clonal anemones: energy balance and quantitative genetics. *American Zoologist*, 39, 12-421. 1999.

ZAMPONI M., DESERTI M. Análisis comporativo entre las morfologías y ecologías de las formas de pólipos (Cnidaria, Hidrozoa, Anthozoa) similares en hábitats disímiles. *Revista Real Academia Galega de Ciencias*, 28, 37-69. 2009.

ZURBENKO, LUO, M. Restoration of Time-Spatial Scale in Global Temperature Data. *American Journal of Climate Change*, 1, 154-163. 2012.