



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS V
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

IGNÁCIO EVARISTO MONTEIRO NETO

Atividade da anidrase carbônica de ostras *Crassostrea brasiliana* em condições naturais dos ciclos de maré e exposição aérea – um estudo em recifes costeiros

**JOÃO PESSOA
2016**

IGNÁCIO EVARISTO MONTEIRO NETO

Atividade da anidrase carbônica de ostras *Crassostrea brasiliana* em condições naturais dos ciclos de maré e exposição aérea – um estudo em recifes costeiros

Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Fisiologia Comparada.

Orientador(a): Prof. Dra. Enelise Marcelle Amado

Coorientador(a): Prof. Dra. Tacyana Pereira de Oliveira

JOÃO PESSOA
2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

M775a Monteiro Neto, Ignácio Evaristo

Atividade da anidrase carbônica de ostras *Crassostrea* brasileira em condições naturais dos ciclos de marés e exposição aérea - um estudo em recifes costeiros [manuscrito] / Ignácio Evaristo Monteiro Neto. - 2016.

38 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Enelise Marcelle Amado, Departamento de Ciências Biológicas".

"Co-Orientação: Profa. Dra. Tacyana Pereira Ribeiro de Oliveira, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Hemolinfa. 2. Brânquia. 3. Manto. I. Título.

21. ed. CDD 639.41

IGNÁCIO EVARISTO MONTEIRO NETO

Atividade da anidrase carbônica de ostras *Crassostrea brasiliana* em condições naturais dos ciclos de maré e exposição aérea – um estudo em recifes costeiros

Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia Comparada

Orientador(a): Prof. Dra. Enelise Marcelle Amado

Coorientador(a): Prof. Dra. Tacyara Pereira de Oliveira

Aprovado em: 24/12/2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Enelise Marcelle Amado (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Elvio Sérgio Figueiredo Medeiros
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Carolina A. Freire
Professora Titular - UFPR
Departamento de Fisiologia

Prof. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

A Deus e ao mundo, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pela oportunidade e sabedoria para construir pensamentos, os quais as vezes se tornam tão complexos a ponto de ficar apenas na imaginação. Pensamentos que envolve razão e sentimentos na vontade de alcançar objetivos.

Agradeço por todas as dificuldades que a pesquisa me impôs, pois demonstrou que a equipe que construí/escolhi supera o que vier, com a perspectiva da benfeitoria e reponsabilidade com o trabalho desenvolvido.

Obrigado ao CNPq pelo financiamento do projeto universal da Enelise Amado (orientadora), tornando viável o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha família que é minha base. Em especial aos meus pais Irenildo Evaristo e Ana Lígia. Obrigado senhor Irenildo e sinto muito pelo constrangimento que passamos na praia da Penha onde fomos assaltados ao contratar um barco para fazer a pesquisa. Graças a Deus não houve nada de mais sério, isso é o mais importante!

O meu muito obrigado a Tony (o cabeça das lagostas), Gomes, Samuell, Marcos Venycius, Otoniel e, Quinho e Caleb (barqueiros), os quais ajudaram de uma forma ou outra nas coletas nos recifes navalhas que são os recifes de ostras do Cabo Branco.

Em especial agradeço a Camilla Rayane que esteve presente desde os campos pilotos os quais duraram cerca de 6 meses de muito planejamento e pensamento do melhor desenho amostral. Ela sabe o verdadeiro trabalho que foi dispendido para a realização dessa pesquisa. Obrigado pelo auxílio no que precisei para as estatísticas. Foi 1 ano e 10 meses de trabalho constante, onde dei o sangue (infelizmente ostras são bem cortantes)!

A todas as pessoas do laboratório (Daniela, Brígida, Tacyana, Matheus, Dani, Otoniel, Kamila, Alice, Sarah, Neto, Jessika, Felipe, Nathalia, Glacy, Maria Helena, Gabrielly, Raissa, Layanne e Elizabeth) obrigado pelo convívio.

Ao Pedro Jusselino, agradeço pelo desenho dos recifes do Cabo Branco. Que trabalhoso que foi em? Te dei bastante trabalho indo ao Cabo Branco, a UFPB várias vezes falar como queria, como achava melhor. É, mas saiu, e ficou perfeito. Obrigado Pedro “Capra”!

Concluo agradecendo a pessoa de maior importância na minha formação acadêmica, onde iniciei a estagiar com ela teoricamente desde setembro de 2012. Foram 4 anos de muitos ensinamentos e experiências adquiridas. Falo “foram” mas pretendo manter vínculo em trabalhos futuros, onde o próximo passo será o mestrado. Parabênizo por ser uma real orientadora, o que poucos sabem ser. É, não foram todos que nasceram para isso! A senhora têm tudo para continuar crescendo na vida científica, parabéns, Enelise Marcelle Amado, que continue sendo quem és.

Obrigado Enelise, por quebrar a cabeça junto comigo nos resultados estatísticos que a primeira vista pareciam coisa de outro mundo, complexos, e são. Grato pelo apoio!

“A verdade não é, de modo algum, aquilo que se demonstra, mas aquilo que se simplifica.”

Antoine de Saint - Exupéry

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
METODOLOGIA	12
Amostragem.....	12
Índice de Condição.....	12
Análise da Atividade da Anidrase Carbônica.....	13
Fatores abióticos.....	13
Análise dos Dados.....	14
RESULTADOS	15
Dados Abióticos.....	15
Índice de Condição.....	18
Atividade da Anidrase Carbônica.....	19
Atividade da Anidrase Carbônica da Hemolinfa.....	19
Atividade da Anidrase Carbônica da Brânquia.....	21
Atividade da Anidrase Carbônica do Manto.....	23
DISCUSSÃO	24
Fatores Abióticos.....	30
CONCLUSÃO	30
ABSTRACT	32
REFERÊNCIAS	33

Atividade da anidrase carbônica de ostras *Crassostrea brasiliana* em condições naturais dos ciclos de maré e exposição aérea – um estudo em recifes costeiros

Ignácio Evaristo Monteiro Neto, Tacyana Pereira de Oliveira & Enelise Marcelle Amado

RESUMO

Anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima presente na maioria dos seres vivos que catalisa a hidratação reversível de CO_2 em HCO_3^- e H^+ . É fundamental em processos fisiológicos como respiração, transporte iônico, regulação ácido-base e calcificação. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de fatores ambientais como a variação da maré e sazonalidade na atividade da AC (AAC) da hemolinfa, brânquia e manto de ostras *Crassostrea brasiliana*. As ostras foram coletadas nos recifes da praia do Cabo Branco em 3 pontos. Ponto 1, o mais próximo da linha da praia, fica na região entre-marés, o ponto 2 intermediário, e o ponto 3 o mais distante da linha da praia. As ostras amostradas nos pontos 1 e 3 ficam expostas ao ar em maré baixa e submersas em maré alta, enquanto as do ponto 2 sempre estão submersas. A hemolinfa, brânquia e manto dos indivíduos foram coletados *in situ* e transportados ao laboratório para a análise da AAC. Os resultados demonstraram que a sazonalidade e variação da maré afetou principalmente a AAC da hemolinfa. Dessa forma, foi observado que a exposição aérea exerce de fato influência na AAC da hemolinfa, brânquia e manto das ostras que sofrem maior tempo de exposição aérea, sendo essas ostras também de menores tamanhos e com menor índice de condição quando comparada às ostras que não sofrem com a exposição aérea.

Palavras-Chave: Hemolinfa. Brânquia. Manto.

INTRODUÇÃO

A anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima, confirmada presente em quase todos os seres vivos, que catalisa a hidratação reversível do dióxido de carbono produzindo bicarbonato e próton H^+ , utilizando o zinco como co-fator. Essa enzima possui um papel fundamental em vários processos fisiológicos como respiração, transporte iônico, regulação ácido-base, calcificação (Henry, 1988; Henry, 1996) e eliminação de resíduos nitrogenados (Lionetto et al, 2000).

As primeiras evidências indiretas da presença da anidrase carbônica nos tecidos de diversos moluscos apareceram em um estudo na primeira metade do século passado (Freeman e Wilbur, 1948). A presença dessa enzima nos tecidos, principalmente no manto, foi diretamente relacionada ao processo de formação da concha, sendo a anidrase carbônica postulada como responsável por gerar o substrato para a deposição de carbonato de cálcio ($CaCO_3$). Confirmando, estudos posteriores demonstraram que ostras expostas à acetazolamida, um potente e específico inibidor da AC, tiveram comprometimento da formação de suas conchas (Wilbur e Jodrey, 1955). Na década de 70, Nielsen e Frieden (1972) analisaram a atividade da anidrase carbônica em diversos tecidos de 21 moluscos, através de uma metodologia que envolve monitoramento do pH, uma vez que o produto da atividade da enzima é a liberação de H^+ . Como resultado encontraram que a atividade da AC era mais alta em ostras (*Crassostrea virginica* e *Ostrea equestris*) do que em outros bivalves ou gastrópodes, sendo a atividade da AC na hemolinfa 10 x mais alta do que nos outros tecidos. Se até o momento era considerado que o principal papel da AC em moluscos era na formação da concha, o esperado seria encontrar maior atividade da enzima no tecido que forma a concha, ou seja, no manto. Mas a alta atividade encontrada na hemolinfa levou os autores a sugerirem que AC em ostras possa ter importante função na respiração.

A participação da anidrase carbônica em processos respiratórios é plausível porque moluscos bivalves, como as ostras, que habitam regiões entre-marés estão sujeitos a períodos regulares de exposição aérea, dependendo de sua distribuição e do ciclo da maré. Assim, durante a maré baixa esses animais passam alguns períodos do dia com suas conchas fechadas e portanto com o processo de troca de O_2 por CO_2 interrompido. Talvez, a alta atividade da anidrase carbônica na hemolinfa reflita uma alta concentração dessa enzima para atuar na remoção do CO_2 durante os períodos de exposição aérea, onde as valvas estão fechadas.

Essa questão da alta atividade da AC na hemolinfa nunca foi de fato esclarecida, e alguns trabalhos atuais com AC em moluscos se dedicaram a analisar os efeitos da hipoxia ou anoxia na expressão de AC em tecidos como a brânquia e o manto. David *et al* (2005), demonstraram que ostras *Crassostrea gigas* quando em exposição a hipóxia por um período de 24 dias apresentaram uma grande variação na expressão da Anidrase Carbônica, ora “upregulated” e ora “downregulated”, onde foi registrado aumento na expressão de mRNA entre o 7-10 dia em brânquia e manto, e posteriormente expressão diminuída entre o 14-17 dia nas brânquias; e manto chegando a uma expressão máxima no 24 dia de exposição. Ivanina (2010) visualizou que a expressão de mRNA da anidrase carbônica não foi significativamente afetada pela anoxia (1, 3 e 6 dias) em hepatopâncreas de *Crassostrea virginica*. Ivanina traz que a resposta transcricional da AC à deficiência de oxigênio é específica de cada tecido, tendo em vista que 30% de saturação do ar como observado por David (2005) resultou numa upregulation de transcritos da AC em brânquia e manto de *C.gigas*, mas não em hepatopâncreas.

Nesse contexto, Zhang *et al* (2012) investigou o genoma de *Crassostrea gigas* submetidas a desafios ambientais e descreve uma hipoxia funcional como consequência do fechamento da concha quando as ostras ficam emersas em períodos de maré baixa, sendo visto que a exposição aérea induziu resposta de um grande número de genes (4420).

É evidente que períodos de emersão que naturalmente ocorrem durante o ciclo das marés representam um grande desafio fisiológico para moluscos bivalves. Embora existam estudos com exposição aérea em laboratório, poucos estudos têm sido desenvolvidos *in situ* para procurar entender os mecanismos fisiológicos utilizados por esses indivíduos para lidarem com o período natural de exposição. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do ciclo sazonal de marés na atividade da enzima anidrase carbônica da hemolinfa, brânquia e manto de ostras *Crassostrea brasiliiana* dos recifes da praia do Cabo Branco – PB em pontos de coleta sob diferentes condições de maré.. O trabalho é inovador sendo o primeiro a analisar a atividade da AC com uma abordagem ecofisiológica, com amostragens realizadas *in situ* sob influência de condições que as ostras enfrentam em seu habitat natural.

Tivemos como hipótese que ostras dos pontos 1 e 3 as quais estão em exposição aérea em maré baixa teriam maior atividade da AC devido ao maior acúmulo de CO₂ durante período de exposição onde os indivíduos mantêm as conchas fechadas para evitar ressecamento tecidual, assim como ostras desse ponto teriam menor índice de condição por terem taxa de filtração interrompida durante maré baixa.

METODOLOGIA

Amostragem

As coletas foram realizadas no inverno (agosto de 2015) e no verão (março de 2016), nos recifes da praia do Cabo Branco (7°8'46.55"S e 34°47'53.15"O), João Pessoa - PB em 3 pontos no período diurno. O ponto 1 é o mais próximo da linha da praia, fica na região entre-marés distante 22 metros da barreira do Cabo Branco. O ponto 2 dista 232 metros da barreira e o ponto 3, o mais distante da linha da praia, fica a 367 metros da barreira (Figura 1). As ostras amostradas nos pontos 1 e 3 ficam naturalmente expostas ao ar em maré baixa e submersas em maré alta, enquanto as do ponto 2 sempre estão submersas nas duas marés.

A amostragem foi realizada em duas etapas nos três pontos, tanto no inverno quanto no verão: (1) Maré baixa, 3 horas após as ostras começarem a ficar expostas na maré baixando e (2) Maré alta, 3 horas após estarem submersas na maré subindo. Dessa forma, com utilização de um transecto de 20 metros disposto paralelamente a barreira (Figura 2), eram coletadas 2 ostras em intervalos de 4 metros. Assim, 60 ostras foram amostradas em cada estação, sendo 20 em cada ponto, 10 em maré baixa e 10 em maré alta. Totalizando amostragem de 120 indivíduos, 60 desses no inverno e 60 no verão. A medida que cada ostra adulta foi retirada do topo dos recifes com auxílio de um "facão", no próprio local de coleta realizou-se a extração da hemolinfa através do músculo adutor com o auxílio de uma seringa de 1 ml e uma agulha de 0,60 x 25 mm. Posteriormente a brânquia e o manto foram extraídos com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas retas, e cada amostra foi imediatamente colocada no gelo e transportadas ao laboratório, onde foram armazenadas em freezer -20°C para posterior ensaio da atividade da Anidrase Carbônica.

Biometria e Índice de Condição

Para a biometria e índice de condição foram coletadas 10 ostras em cada ponto amostral, sendo amostradas 2 ostras a cada 4 metros em um transecto de 20 metros disposto no topo dos recifes. Em laboratório realizou-se a medida e a pesagem dos indivíduos. Com o auxílio de um paquímetro foi realizada a medida do comprimento, largura e altura de cada um dos indivíduos. Após a medida, os indivíduos foram sacrificados e em uma balança analítica (SHIMADZU AUY220) a concha e o conteúdo visceral total (tecidos moles) foram pesados. A análise do índice de condição ocorreu de acordo como Lucas e Beninger (1985) que consiste na seguinte relação: peso do conteúdo visceral total / peso da concha * 100.

Análise da Atividade da Anidrase Carbônica

As amostras de brânquias e mantos foram homogeneizadas utilizando homogenizador (HOMO MIX) a 10% peso/volume com tampão tris-fosfato (225 mM Manitol, 75 mM Sacarose, 10 mM Tris Base, 10 mM NaH₂PO₄), pH 7,4. Após centrifugação (2000 x g, 5 min, 4°C) na centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5810R), foi retirado o sobrenadante dos eppendorfs. Parte do sobrenadante foi utilizado para a determinação do teor total de proteína, e parte para o ensaio da enzima. O ensaio da anidrase carbônica foi realizado seguindo o método estabelecido por Vitale *et al.* (1999) baseado em Henry (1991), onde a queda no pH de uma mistura de 7,5 ml do tampão tris fosfato + 50 µl do homegeneizado tecidual ou da hemolinfa + 1 ml de água destilada saturada com gás carbônico (substrato para a enzima) foi monitorado durante 20 s com leituras a cada 4 s, utilizando um medidor de pH de bancada (pH Meter PHS-3E). Para cada amostra, a taxa da reação catalisada (RC) foi estimada pelo coeficiente angular de uma regressão linear ($R^2 \geq 0.99$) estabelecido entre pH e tempo (4 a 20 s). A taxa da reação não catalisada (RNC) foi determinada usando apenas a solução tampão de homogeneização do tecido sem o homogeneizado. Foi calculado atividade específica da anidrase carbônica (AAC) como: $AAC = [(RC / RNC) - 1] / \text{mg de proteína}$ (Vitale *et al.*, 1999).

O teor total de proteína dos homogeneizados de tecidos foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Bradford (1976) utilizando diluição de 1:2, e albumina bovina como padrão. A quantificação de proteínas foi dada pela leitora de microplacas (Spectra Max® i3-Molecular Devices). Para hemolinfa, as análises seguiram mesma metodologia, porém, a hemolinfa não foi homogeneizada pelo homogenizador (HOMO MIX), nem passou por centrifugação. Antes do ensaio da AC para cada amostra, a hemolinfa foi apenas homogeneizada no VORTEX QL-901, assim como todos os sobrenadantes dos homegeneizados de brânquia e manto.

Fatores Abióticos

Fatores abióticos como salinidade, temperatura e pH foram medidos com o auxílio de uma sonda multiparamétrica (HI 9821 - HANNA), e turbidez da água com utilização de um turbidímetro (TB-1000 MS TECNOPON). A variação de maré, sazonalidade, pH, temperatura e turbidez da água foram analisados a fim de verificar se influenciam na AC da hemolinfa e tecidos.

Análise dos Dados

Os dados foram analisados através de estatística descritiva e foram apresentados como média (\pm erro padrão). Todos os dados tiveram a normalidade testada através do teste de *Shapiro-wilk* para definição do teste estatístico a ser utilizado. Desta forma, os dados da Anidrase Carbônica da hemolinfa, brânquia e manto não apresentaram distribuição normal. Também foi testado a homogeneidade das variâncias utilizando o teste de *Levene*, e os dados apresentaram variação não homogênea.

Desta forma, para verificar a ocorrência de diferença entre a atividade da anidrase carbônica entre os pontos amostrais, maré e sazonalidade foi realizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

Os dados relacionados a Índice de Condição apresentaram distribuição normal e homogênea, sendo realizado teste paramétrico ANOVA One-Way.

Para ambos os testes foi utilizado o programa *Statistica 10*, utilizando nível de significância de $p < 0,05$.

Figura 1. Desenho amostral representando pontos 1, 2 e 3 nos recifes da Praia do Cabo Branco-PB.

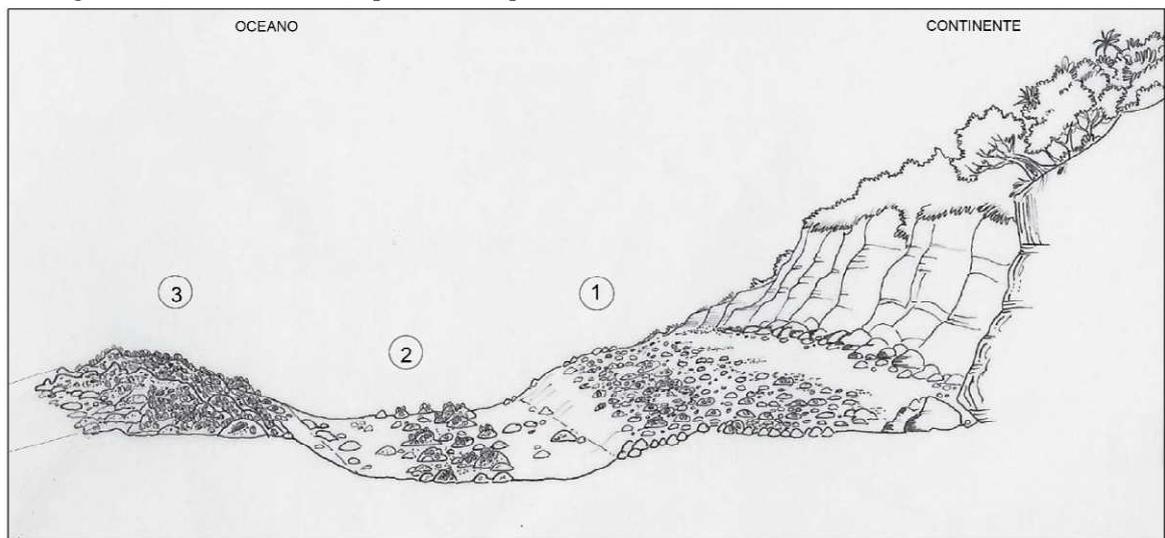


Ilustração: AQUINO NETO, P.J.

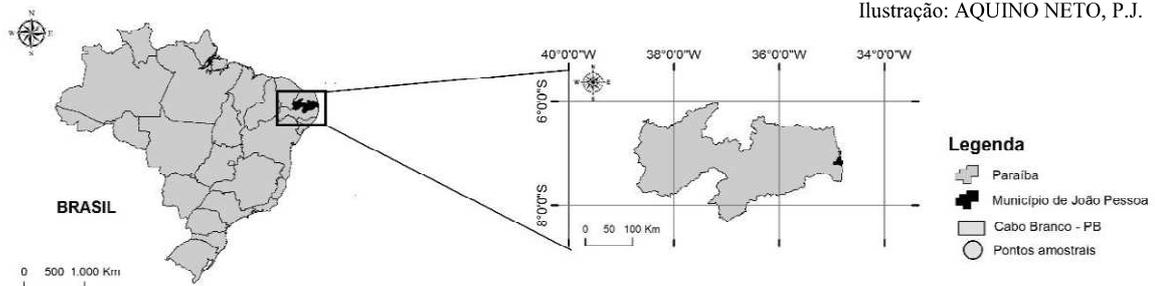


Figura 2. Transecto de 20 metros paralelo a barreira do Cabo Branco para amostragem das ostras nos recifes.



Foto: MONTEIRO NETO, I.E.

RESULTADOS

Dados abióticos

A temperatura apresentou variação entre o inverno e o verão. A salinidade demonstrou pouca variação tanto em relação as marés quanto estação do ano. Quanto ao pH, foi observado valores mais altos na maré alta e no verão. Em relação à turbidez da água (NTU) foi observado grande variação, apresentando valores mais altos na maré alta e no inverno (Tabela 1, Figura 3). Os recifes do Cabo Branco apresentam nos pontos de coleta as respectivas alturas: Ponto 1 ($23.4\text{cm} \pm 8.6$), Ponto 2 ($48\text{cm} \pm 6.3$), Ponto 3 ($97.2\text{cm} \pm 13.2$). A pluviosidade média encontrada em agosto de 2015(inverno) foi de 52,3mm e em março de 2016 (verão) de 148mm (AESAs, 2016).

Figura 3. Aumento da turbidez na coluna d'água devido ao desmoronamento da Barreira do Cabo Branco, João Pessoa – PB.



Foto: MONTEIRO NETO, I.E.

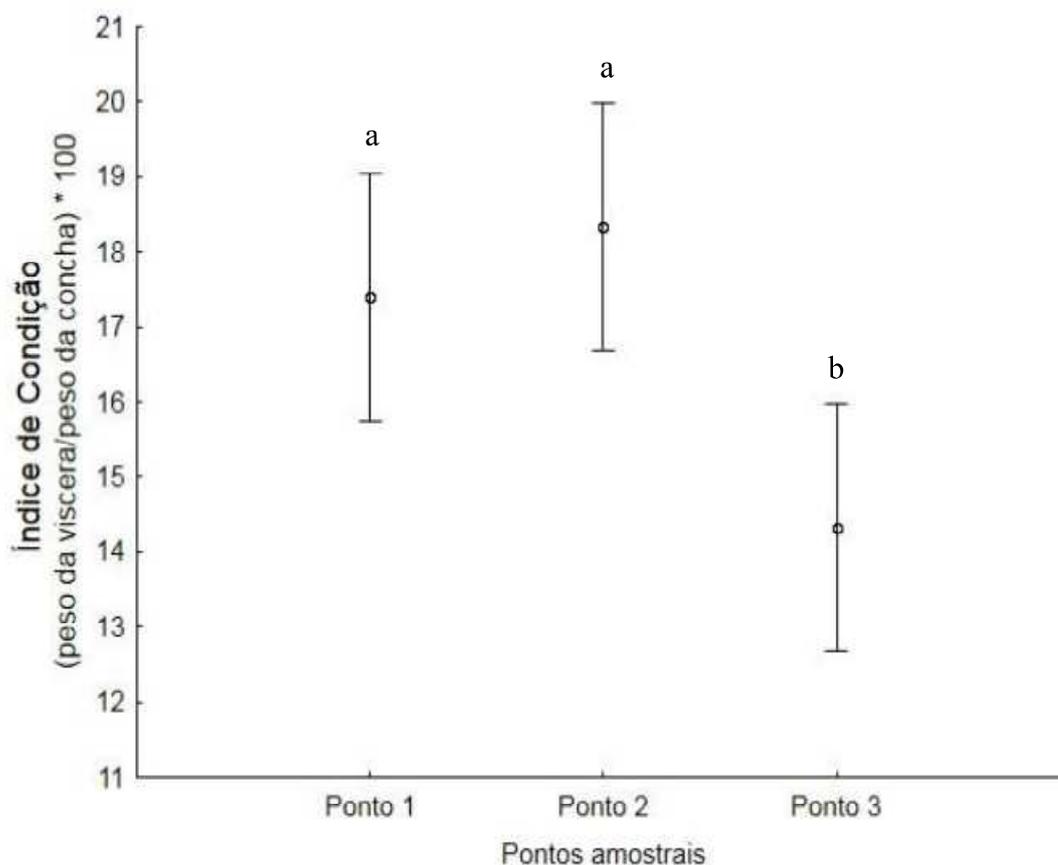
Índice de Condição

Os dados de biometria estão representados como média \pm erro padrão (Tabela 2). O índice de condição das ostras dos 3 pontos amostrais é apresentado como média e erro padrão (Figura 4).

Tabela 2. Dados biométricos e de índice de condição de *C. brasiliiana* dos três pontos amostrais, sendo Comp. = comprimento, Larg. = largura e Alt. = altura.

	Comp. (mm)	Larg. (mm)	Alt. (mm)	Peso da Concha (g)	Peso da Viscera (g)
Ponto 1	36.46 \pm 1.44	23.5 \pm 1.3	13.03 \pm 1	6.8 \pm 0.5	1.17 \pm 0.1
Ponto 2	39.55 \pm 1.6	29,5 \pm 1.7	14.1 \pm 1	9.8 \pm 1	1.8 \pm 0.21
Ponto 3	37.98 \pm 1.45	25.8 \pm 1.1	11.1 \pm 0.7	7.01 \pm 0.6	1 \pm 0.1

Figura 4. Diferença do Índice de Condição das ostras *Crassostrea brasiliiana* entre os pontos amostrais no recife da Praia do Cabo Branco – PB. Letras diferentes indicam diferença estatística.



Atividade da Anidrase Carbônica

Os valores encontrados no inverno e verão para a atividade da enzima anidrase carbônica na hemolinfa e nos tecidos analisados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias da atividade da Anidrase Carbônica na Hemolinfa (/ml de hemolinfa), Brânquia (/mg de proteína) e manto (/mg de proteína) de *Crassostrea brasiliana* no Inverno e no Verão. B1- maré baixa ponto 1; B2-maré baixa ponto 2; B3- maré baixa ponto 3; A1- maré alta ponto 1; A2- maré alta ponto 2; A3- maré alta ponto 3. (Dados apresentados como média \pm erro padrão).

Estações do ano	Atividade da Anidrase Carbônica					
	B1	B2	B3	A1	A2	A3
Inverno						
Hemolinfa	58.2 \pm 15.8	87.86 \pm 11	167.8 \pm 10.5	62.2 \pm 8.13	31.9 \pm 6.57	36.66 \pm 9.68
Brânquia	6.5 \pm 1.5	6.55 \pm 1.3	8.7 \pm 2.5	1.57 \pm 0.43	2.57 \pm 0.51	5.56 \pm 0.97
Manto	1.52 \pm 0.39	3.86 \pm 0.71	3.87 \pm 1.05	3.09 \pm 0.34	3.55 \pm 0.66	6.73 \pm 1.18
Verão						
Hemolinfa	73.76 \pm 7.1	52.69 \pm 9.48	45.25 \pm 8.91	71.46 \pm 10.8	18.56 \pm 4.7	93.19 \pm 6.71
Brânquia	3.27 \pm 1.92	-----	4.43 \pm 2.38	9.10 \pm 2.74	3.73 \pm 0.86	8.77 \pm 1.65
Manto	17.44 \pm 4.27	3.35 \pm 0.83	4.42 \pm 1.16	7.01 \pm 1.53	1.23 \pm 0.24	2.92 \pm 0.6

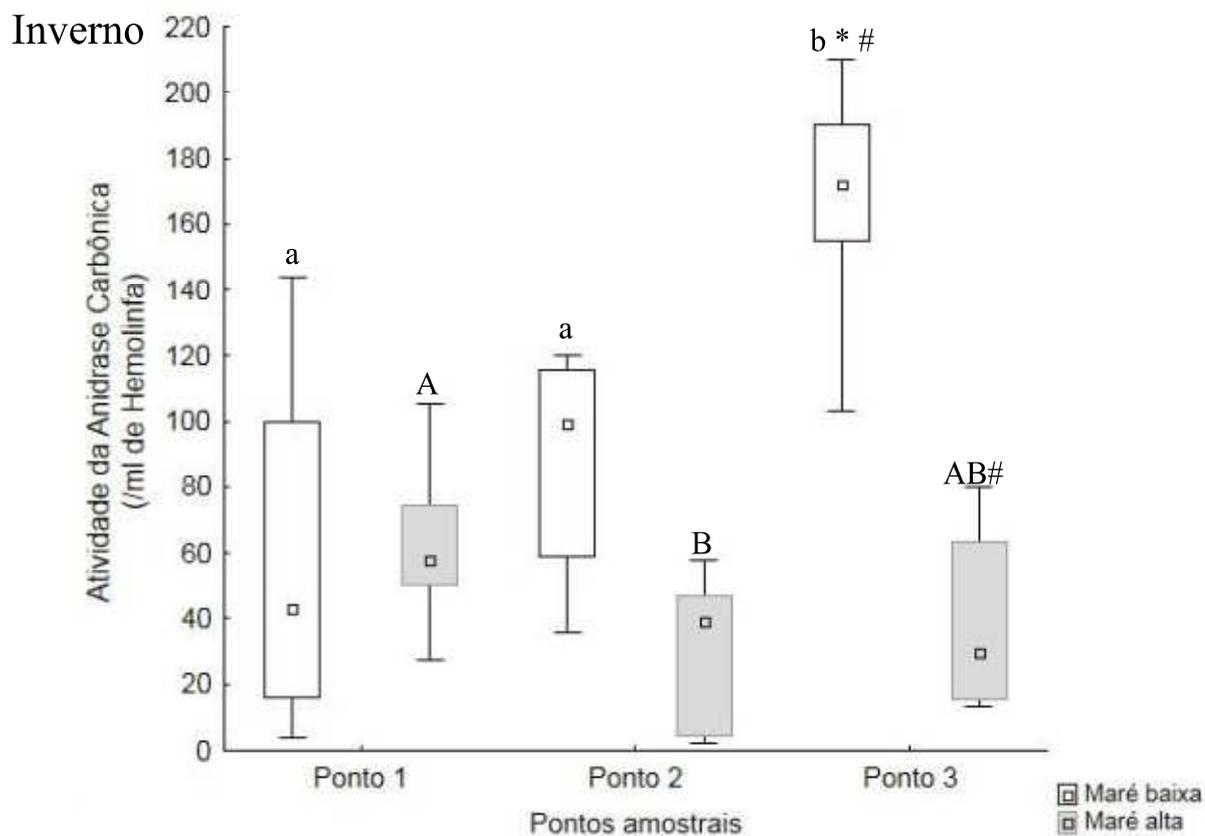
Hemolinfa

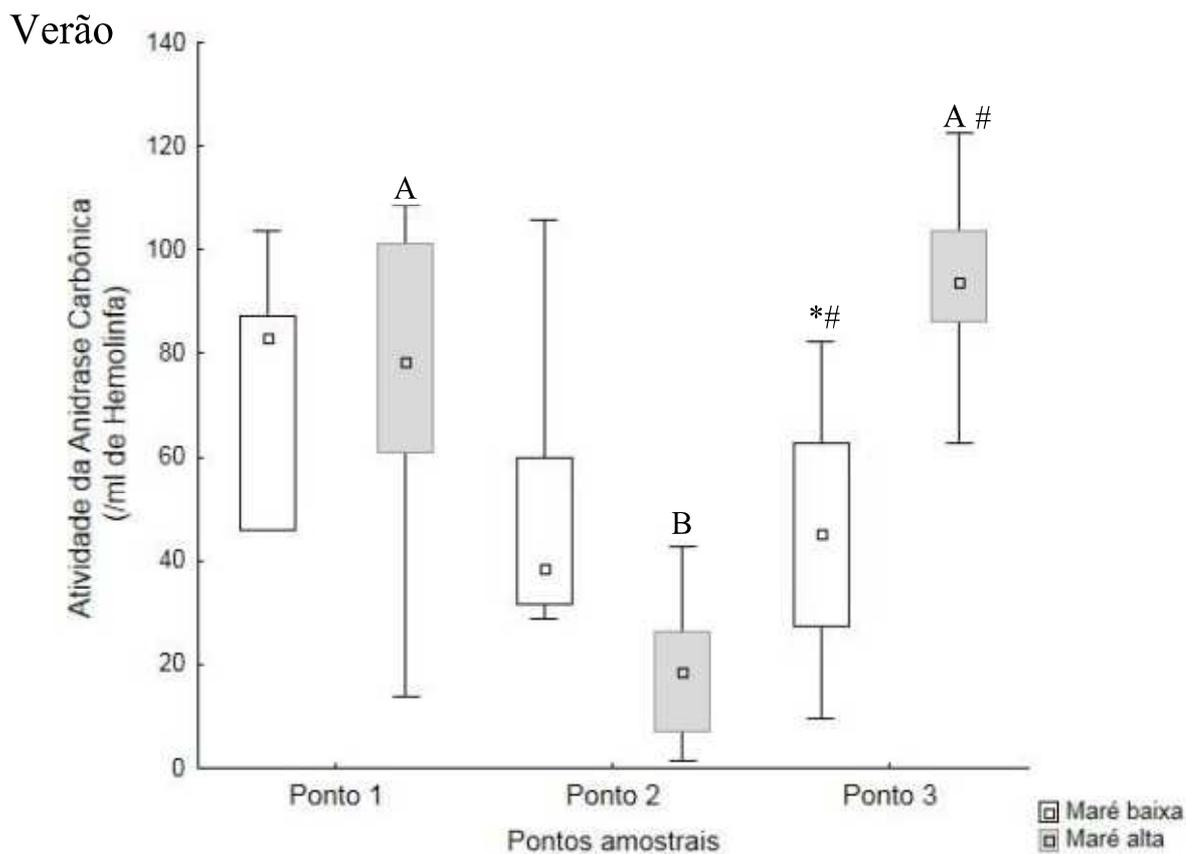
No inverno foi identificada maior AAC da hemolinfa do ponto 3 quando comparado aos pontos 1 e 2 na maré baixa ($H_{(2,28)} = 16,327$, $p = .0003$). Na maré alta a diferença encontrada foi apenas entre o ponto 1 e ponto 2 ($H_{(2, 26)} = 6,629$, $p = .0363$). Comparando cada ponto entre maré baixa e maré alta foi visualizado diferença (aumento) na AAC da hemolinfa apenas no ponto 3 ($H_{(5, 54)} = 30,08$, $p = .0000$) (Figura 5 Inverno).

No verão, em maré alta, foi observado maior AAC nos pontos 1 e 3 em relação ao ponto 2 ($H_{(2,27)} = 13,727$, $p = .0010$). Na comparação da AAC de cada ponto entre maré baixa e maré alta foi obtido diferença (diminuição) apenas no pontos 3 ($H_{(5,54)} = 26,056$, $p = .0001$) (Figura 5 Verão).

Entre inverno e verão foi observado diferença na AAC no pontos 3 tanto em maré alta ($H_{(5,53)} = 28,3718$, $p = .0000$) como em maré baixa ($H_{(5,55)} = 26,878$, $p = .0001$) (Figura 5 Inverno e 5 Verão).

Figura 5. Diferença da Atividade da Anidrase Carbônica da Hemolinfa (/ml de hemolinfa) dos pontos amostrais em relação a maré alta e maré baixa nas estações de inverno e verão. Letras minúsculas representam diferença entre os pontos na maré baixa, letras maiúsculas representam diferença estatística entre os pontos na maré alta. * indica diferença em cada ponto entre maré baixa e maré alta. # indica diferença em cada ponto entre inverno e verão.



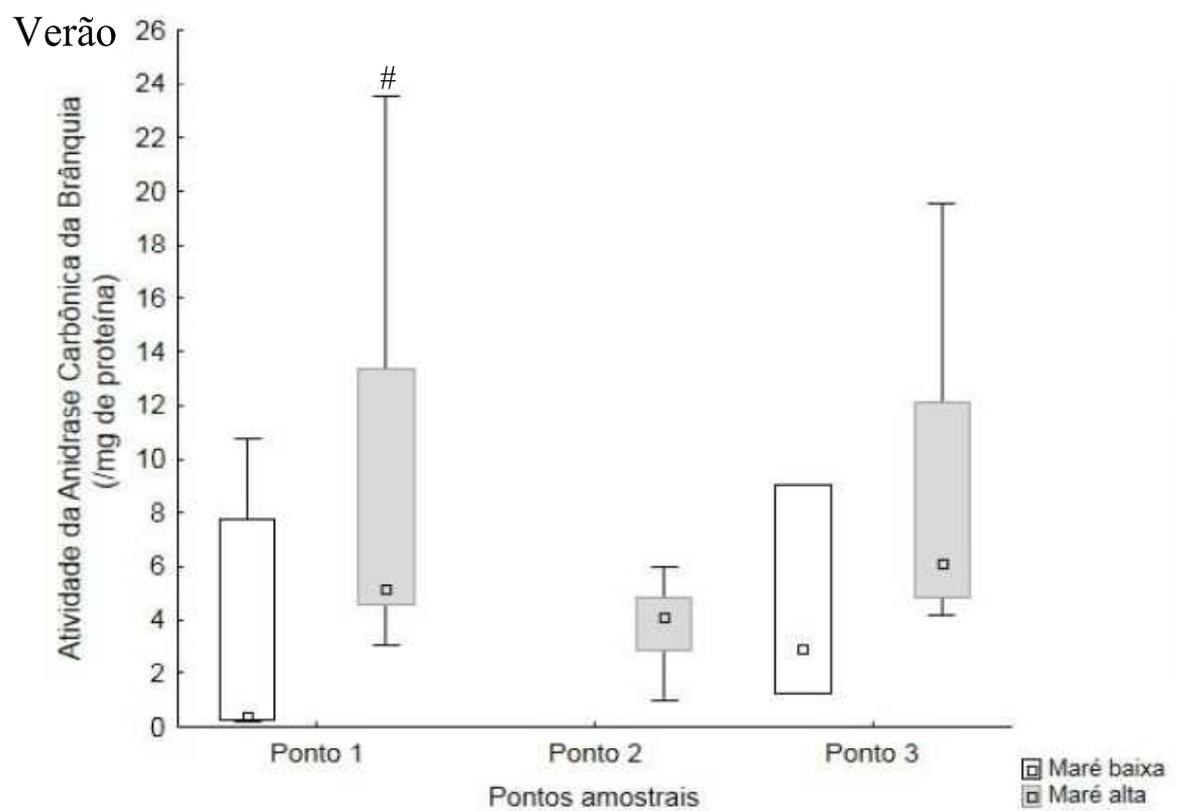
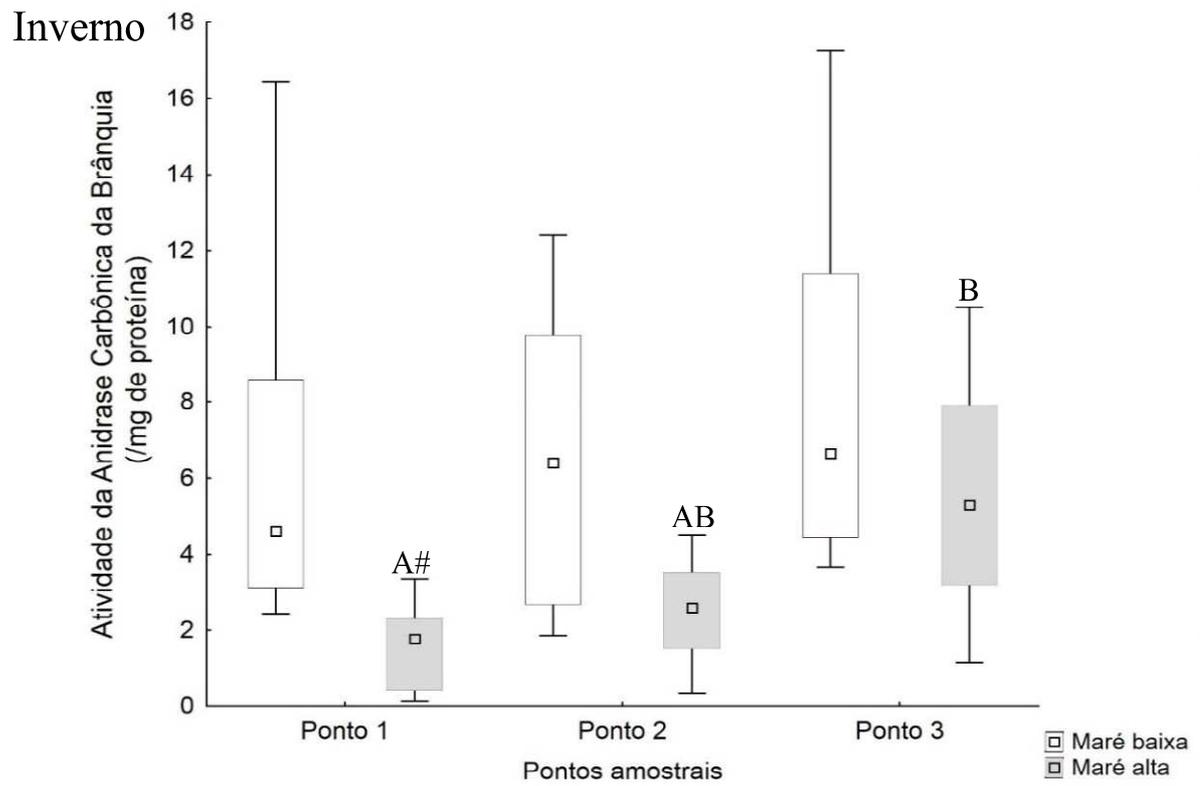


Brânquia

No inverno não houve diferença da AAC entre os pontos na maré baixa. Na maré alta observou-se maior AAC no ponto 3 quando comparado ao ponto 1 ($H_{(2,24)} = 9,1008$, $p = .0106$) (Figura 6 Inverno).

Em relação a sazonalidade foi observado diferença na AAC apenas no ponto 1 em maré alta ($H_{(5,46)} = 23,77$, $p = .0002$) sendo a AAC mais baixa no verão do que no inverno (Figura 6 Inverno e 6 Verão).

Figura 6. Diferença da Atividade da Anidrase Carbônica da Brânquia (/mg de proteína) dos pontos amostrais em relação a maré alta e maré baixa nas estações de inverno e verão. Letras minúsculas representam diferença entre os pontos na maré baixa, letras maiúsculas representam diferença estatística entre os pontos na maré alta. * indica diferença em cada ponto entre maré baixa e maré alta. # indica diferença em cada ponto entre inverno e verão.



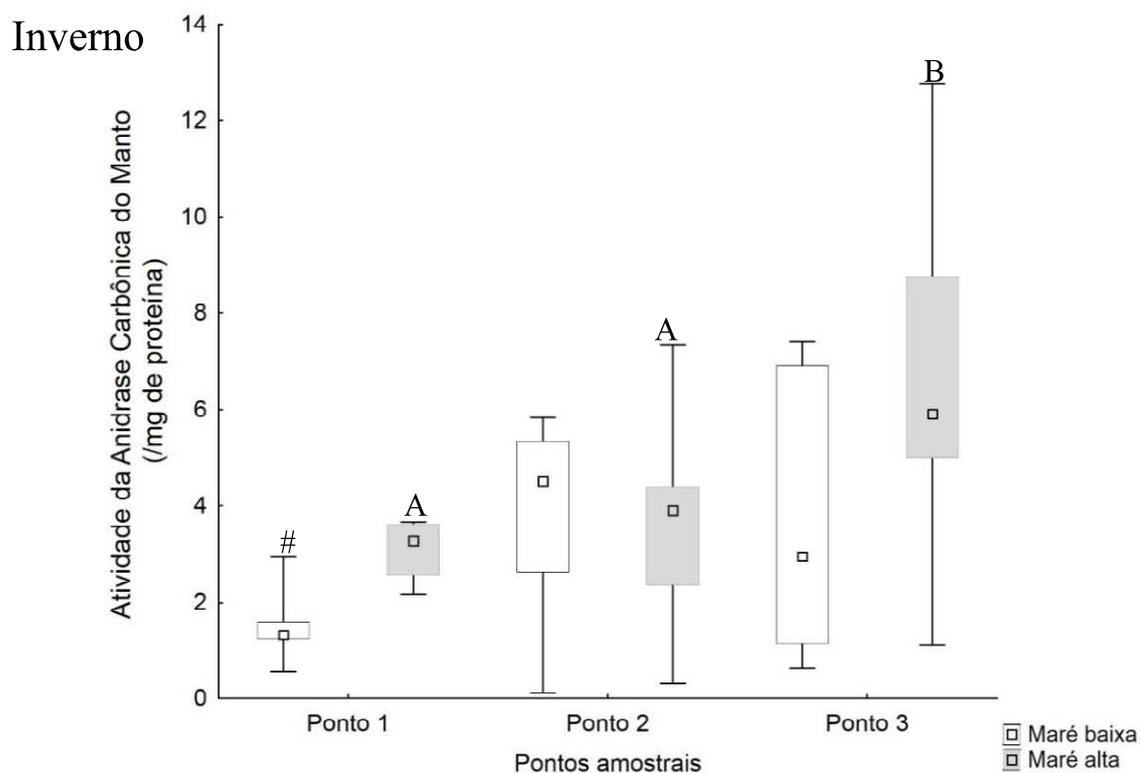
Manto

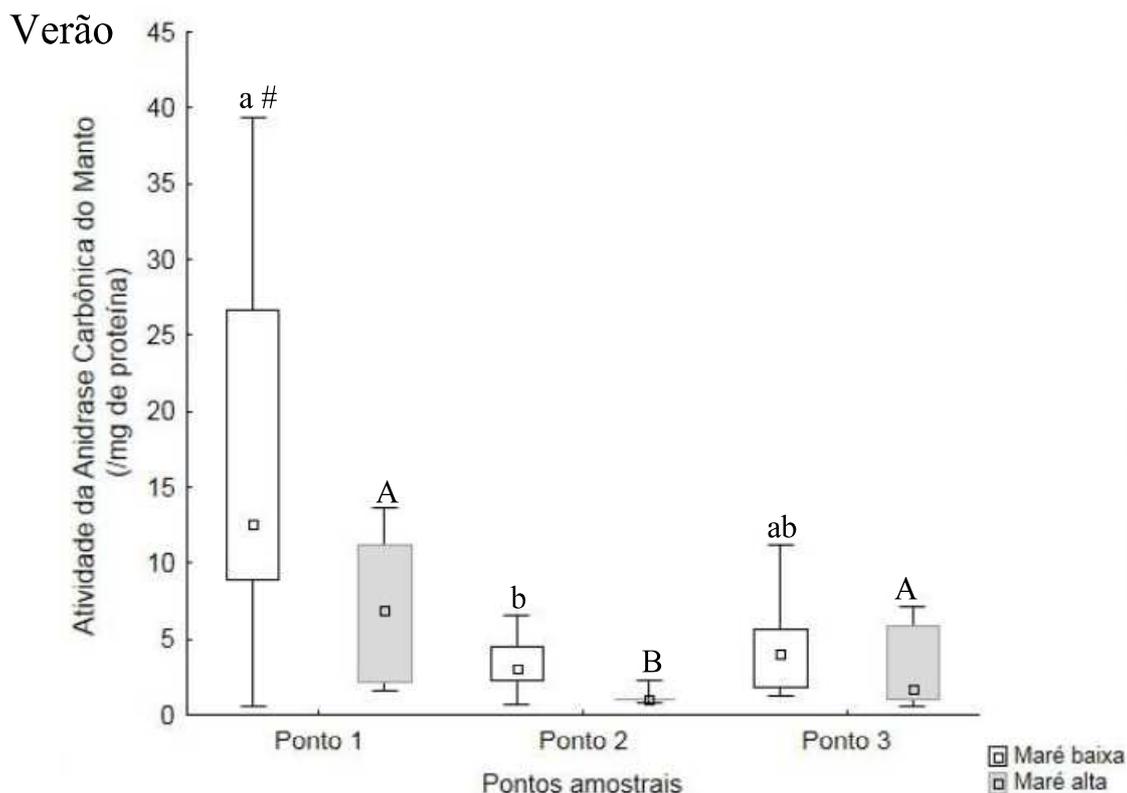
Na maré alta observou-se maior AAC no ponto 3 em relação ao ponto 1 ($H_{(2,23)} = 7,3266$, $p = .0256$) (Figura 7 Inverno).

No verão, em maré baixa, a AAC do ponto 1 foi mais alta quando comparada ao ponto 2 ($H_{(2,23)} = 8,5132$, $p = .0142$). Em maré alta, a AAC dos pontos 1 e 3 foram mais altas do que a AAC do ponto 2 ($H_{(2,21)} = 8,6111$, $p = .0135$) (Figura 7 Verão).

Entre as estações, a AAC do ponto 1 em maré baixa ($H_{(5,43)} = 15,6603$, $p = .0079$) foi maior no verão quando comparado ao inverno (Figura 7 Inverno e 7 Verão).

Figuras 7. Diferença da Atividade da Anidrase Carbônica do Manto (/mg de proteína) dos pontos amostrais em relação a maré alta e maré baixa nas estações de inverno e verão. Letras minúsculas representam diferença entre os pontos na maré baixa, letras maiúsculas representam diferença estatística entre os pontos na maré alta. * indica diferença em cada ponto entre maré baixa e maré alta. # indica diferença em cada ponto entre inverno e verão.





DISCUSSÃO

A anidrase carbônica é uma das mais importantes enzimas para o funcionamento de um organismo vivo, e está presente em numerosos processos metabólicos que envolvem CO_2 . A AC têm sido frequentemente estudada há décadas em diferentes moluscos. Entretanto, ao nosso conhecimento não existe na literatura nenhum estudo em ambiente natural. Esse trabalho, é o primeiro a analisar a atividade da enzima anidrase carbônica da hemolinfa, brânquia e manto de ostras marinhas, *Crassostrea brasiliana*, com as amostragens realizadas *in situ* sob influência do ciclo das marés.

Alguns estudos têm demonstrado que dados obtidos em experimentos de respostas fisiológicas à hipoxia realizados em laboratório diferem de dados obtidos para condição natural (Spicer, 2014). De fato, nossos resultados não seguiram um padrão e apresentaram uma variabilidade na atividade da enzima, ora “upregulated”, ora “downregulated”, em diferentes condições, o que torna difícil tecer uma conclusão definitiva. Essa dificuldade é compreensível, uma vez que nesse trabalho em ambiente natural a única variável controlada foi o tempo em que as ostras ficaram submersas ou emersas antes de serem

coletadas. Entretanto, existe uma consistência entre os resultados: as variações na atividade da enzima só foram encontradas nos pontos de amostragem em que as ostras ficam expostas durante a maré baixa (pontos 1 ou 3), mas nunca no ponto onde elas ficam o tempo todo submersas (ponto 2). Além disso, a atividade da AC das ostras submersas sempre foi mais baixa ou igual à das ostras que ficam emersas. Também, os valores obtidos da atividade da AC na hemolinfa corroboram resultado observado por Nielsen & Frieden (1972), onde a AAC na hemolinfa foi cerca de dez vezes maior que na brânquia e manto.

As ostras que se encontram emersas da água, em exposição ao ar, (pontos 1 e 3 em maré baixa), utilizam o mecanismo de manter a concha fechada para evitar o ressecamento tecidual, podendo gerar um aumento na concentração de CO₂ no seu interior, o que pode acarretar numa maior atividade da enzima anidrase carbônica, já que o CO₂ é substrato da enzima. A AAC aumentada na hemolinfa de indivíduos do ponto 3 em maré baixa no inverno, pode ser uma estratégia utilizada pelas ostras para tornar o seu interior menos instável quanto as altas concentrações de CO₂, o que pode ser tóxico para os indivíduos. Vários estudos demonstram que ostras em exposição ao ar são acometidas a condição de acidose respiratória como observado por Booth *et al* (1984), Dwyer & Burnett (1996) e Michaelidis *et al* (2005) levando a uma diminuição do pH na hemolinfa. Dwyer & Burnett (1996) observaram que *Crassostrea virginica* desenvolveu acidose respiratória induzida por exposição aérea, sendo a fonte primária dessa acidose a retenção de CO₂ produzido metabolicamente durante o período de valva fechada.

Contrário as ostras dos pontos 1 e 3, os bivalves do ponto 2 podem manter suas conchas abertas tanto em maré baixa quanto em maré alta, uma vez que estão sempre submersas e não necessitam de mecanismo de fechamento das valvas para evitar a desidratação dos tecidos. Dessa forma esses animais não acumulam CO₂ em seu interior, sendo portanto menos dependentes da atuação da AC para lidar com esse acúmulo e seus efeitos.

Um maior acúmulo de CO₂ e a consequente acidificação da hemolinfa é esperado ocorrer em função de metabolismo aeróbico, e embora não exista na literatura informações sobre consumo de oxigênio durante exposição aérea em *C. brasiliensis*, consumo de O₂ durante a exposição aérea pode ocorrer em outras espécies de bivalve. *Crassostrea rizophorae*, por exemplo, apresenta “air-gaping” (abertura da concha) durante períodos de emersão (Littlewood, 1989ab) e um estudo que analisou a razão entre consumo de oxigênio na respiração aérea/respiração aquática sugerem alta aerobicidade

durante as primeiras 2 horas de exposição aérea (Littlewood, 1989a). Em *Mytilus edulis* os níveis de oxigênio do fluido da cavidade do manto caíram rapidamente durante a emersão por 24 horas, entretanto, nunca alcançou anoxia, o que pode indicar algum consumo de oxigênio nesses mexilhões durante a emersão (Sadok et al, 1999).

Contrariamente, em *Crassostrea virginica* durante um experimento de exposição aérea o consumo de oxigênio no ar foi menor do que 0,1% do consumo de oxigênio na água do mar sugerindo que durante a exposição aérea as ostras fecham suas conchas e se isolam do ambiente (Willson e Burnett, 2000). Entretanto, apesar do baixo consumo de O₂ nesses períodos, uma acidificação da hemolinfa de ostras em exposição aérea também pode ocorrer em função da entrada de produtos do metabolismo anaeróbico na hemolinfa desses animais, uma vez que estudos sugerem transição para o metabolismo anaeróbico durante os períodos de exposição aérea (Ahmad e Chaplin, 1984; Widdows e Shick, 1985). Dessa forma, tanto em animais que realizam metabolismo aeróbico, quanto os que realizam metabolismo anaeróbico, a AC da hemolinfa pode ser importante para o tamponamento do pH da hemolinfa, e isso explicaria a alta atividade da AC na hemolinfa dos animais mais sujeitos à exposição aérea e conseqüentemente mais sujeitos à uma condição de acidose.

Em *Crassostrea virginica* (Dwyer & Burnett, 1996), e em *Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*, a exposição aérea levou a uma redução do pH da hemolinfa, apresentando também diminuição da PO₂ e aumento da PCO₂ e da concentração de HCO₃⁻, resultando em acidose, a qual foi parcialmente compensada pela mobilização de Ca²⁺ provavelmente das reservas de CaCO₃ da concha (Booth *et al*, 1984; Michaelidis *et al*, 2005). A anidrase carbônica está envolvida na calcificação e descalcificação, quando bicarbonato e cálcio se combinam (reversivelmente) para formar carbonato de cálcio. Assim, a atividade aumentada da AC de *C. brasiliiana* no ponto em que ficam mais tempo em condição de exposição aérea (ponto 3) pode estar relacionada com o tamponamento da hemolinfa, mobilizando tanto bicarbonato como cálcio estocados na concha. Essa mobilização de íons Ca²⁺ da concha para compensação do pH da hemolinfa pode levar a um comprometimento do crescimento do animal. De fato, Michaelidis *et al* (2005), encontraram que exposição a hipercapnia levou a um comprometimento do crescimento de *Mytilus galloprovincialis* possivelmente relacionado com uma redução na taxa metabólica e dissolução de CaCO₃ da concha como resultado de uma acidose extracelular.

É possível que isso também esteja ocorrendo com *Crassostrea brasiliiana*. Nossos resultados indicam menor morfometria e índice de condição (tanto o peso da concha como

o peso dos tecidos moles estão diminuídos) nas ostras do ponto 3. São as ostras desse ponto que apresentaram maior atividade da AC, provavelmente devido a altura do recife como agravante da condição aérea, já que essas ostras passam mais tempo expostas e portanto sofrendo as consequências de uma possível acidose. Os resultados de IC corroboram com Roegner e Mann (1995) que encontraram a taxa de crescimento (área da concha) de ostras *Crassostrea virginica* intertidais menor quando comparadas com ostras imersas da zona subtidal. Porém, no nosso estudo o único ponto que apresentou diferença foi o ponto 3, possivelmente devido a distribuição das ostras se dar em recifes mais elevados, sofrendo com acidose prolongada e menor taxa de filtração.

Entretanto, esse aumento na atividade da enzima na maré baixa quando comparado à maré alta observado no ponto 3 no inverno, não ocorreu no verão. No verão o observado foi justamente o inverso: menor atividade da enzima na maré alta, quando comparado com a maré baixa no ponto 3. Essa diferença pode ser significado de algum evento relacionado à sazonalidade, como temperatura, precipitação de chuvas ou ainda à algum evento pontual de interferência antrópica. As ostras do ponto 3 apresentaram atividades alteradas em relação a sazonalidade em maré alta e em maré baixa, e de acordo com Child & Laing (1998) mudanças de temperatura associada a sazonalidade podem ter efeitos profundos sobre a biologia do bivalve. No entanto, as ostras que lidam com exposição aérea apresentaram atividade da AC na hemolinfa bem mais alta do que as ostras que ficam submersas, o que ainda sugere a importância dessa enzima para esses animais durante os períodos de emersão.

As ostras em exposição ao ar podem ter maiores AAC da hemolinfa como foi visto nos animais do ponto 3. Porém, esse mesmo padrão não foi observado na ostras do ponto 1, que também enfrentam períodos de exposição aérea. Além da altura dos recifes do ponto 1 ser menor do que a altura do ponto 3, o que implica em um menor tempo de exposição dessas ostras em maré baixa, uma particularidade do ponto 1 pode explicar a menor capacidade dessas ostras em regular a AAC nas duas marés. O ponto 1 é o ponto mais próximo da Barreira do Cabo Branco, a qual vem sofrendo com o desmoronamento e grande parte do sedimento em suspensão na coluna de água é provinda da barreira (obs pessoal). De fato, nossos resultados indicam maior turbidez da água justamente nesse ponto, então as ostras quando submersas recebem uma grande carga de sedimento e de acordo com Gray (2002) a mistura vertical aumenta o total de sólidos em suspensão tornando a água hipóxica ou até anóxica. Portanto, durante a submersão as ostras podem estar sofrendo hipóxia e no período que não estão submersas as ostras estão em exposição

ao ar, ou seja em hipóxia. Condições de hipóxia afetam o metabolismo dos indivíduos, como visto para *C. gigas* por David *et al* (2005), Kraffe *et al* (2013) e Sussarellu *et al* (2012). Assim essas ostras podem estar sofrendo estresse crônico, e esse estresse pode explicar a perda da capacidade dessas ostras do ponto 1 em regular a atividade da AC nos períodos entre maré baixa e maré alta, diferente do encontrado para o ponto 3 o qual no inverno as ostras “upregulated” e no verão “downregulated” em condição de hipóxia (expostas ao ar, maré baixa).

Ainda, a alta quantidade de sedimento em suspensão no ponto 1, pode influenciar na bioacumulação de metais pelas ostras, como demonstrado por Lee *et al* (2015), que a absorção de zinco por ostras *Saccostrea glomerata* ocorrem predominantemente através da ingestão dietética de partículas de sedimentos contaminados na coluna de água, outro fator que pode justificar a perda de regulação enzimática de ostras do ponto 1, nas duas marés e nas diferentes estações.

Em relação às brânquias, a maior atividade da AC foi encontrada no ponto 3 em maré alta. A anidrase carbônica nas brânquias de molusco está relacionada com o processo de formação de suas conchas porque um peptídeo semelhante à calcitonina chamado CGRP foi identificado por aumentar a atividade da AC na brânquia de moluscos bivalves (Duvail *et al*, 1998; Cudennec *et al*, 2006). O CGRP está implicado no processo de calcificação ativando por sua ação específica a AC branquial que por sua vez participa com a formação de íons bicarbonato (HCO_3^-) para ser transportado para o local de biomineralização (manto) onde ocorre a deposição de CaCO_3 na concha (Cudennec *et al*, 2006). Mas a AC branquial também pode estar envolvida na excreção de amônia. Em organismos aquáticos a AC branquial é apontada como facilitadora do transporte de amônia por fornecer ions H^+ (catalisando a hidratação do CO_2) para o protonamento de NH_3 em NH_4^+ (Henry, 1996; Weihrauch *et al*, 2009).

Embora não tenhamos medido a taxa de excreção de amônia, é possível que a alta atividade da AC branquial em maré alta no ponto 3 inverno seja reflexo da participação da AC no aumento de excreção de amônia após o período de exposição aérea. Widdows & Shick (1985) encontraram um aumento progressivo na taxa de excreção de amônia de *Mytilus edulis* durante a re-imersão após um período de 5 horas em exposição aérea. Esse aumento gradual atingiu uma taxa máxima de excreção após 2 horas em que os animais foram re-submersos. Byrne & McMahon, (1994) visualizaram que a produção de amônia cessa em bivalves emersos e retoma durante a re-imersão, indicando uma alta confiança no catabolismo não protéico durante a emersão.

Entretanto, no ponto 1 (onde as ostras também ficam emersas) não houve aumento na atividade da enzima, mas nesse caso deve-se considerar a altura dos recifes, e portanto o tempo de exposição aérea. No ponto 3, o recife é bem mais alto do que no ponto 1 e embora tenhamos fixado o tempo de 3 horas após o enchimento da maré para coletar os tecidos, devido a altura dos recifes o tempo de exposição aérea para as ostras do ponto 3 é maior do que no ponto 1, o que pode refletir numa maior necessidade das ostras desse ponto em excretar amônia logo após a re-imersão. O mesmo padrão não foi observado no verão, onde não houve diferença na atividade da AC branquial entre os pontos de coleta.

Foi visto que em maré baixa a exposição aérea não teve efeito sobre a AAC branquial, diferentemente de David *et al* (2005) que demonstraram em experimento laboratorial que ostras *C. gigas* quando em exposição a hipóxia por um período de 24 dias apresentaram uma grande variação na expressão da Anidrase Carbônica, ora “upregulated” e ora “downregulated”, sendo registrado aumento na expressão de mRNA entre o 7-10 dia, e posteriormente expressão diminuída entre o 14-17 dia nas brânquias, esse trabalho não demonstrou diferença na AAC em exposição ao ar por 3h (condição natural em ambiente recifal).

No manto, a atividade da AC, assim como nos outros tecidos, também foi maior nos pontos em que as ostras ficam expostas ao ar quando comparadas às ostras que ficam sempre submersas, indicando a importância da AC no enorme desafio fisiológico que é a exposição aérea. Esse padrão de maior atividade aconteceu principalmente em maré alta e uma maior atividade da AC nesses pontos pode estar relacionada com o retorno de íons Ca^{2+} para sua estocagem na concha uma vez que a AC trabalha de modo reversível, e em moluscos a AC do manto está principalmente relacionada com a deposição de $CaCO_3$ na concha. Entretanto, no manto, uma alta atividade da AC foi encontrada nas ostras do ponto 1 em maré baixa no verão. Além da hipóxia resultante da exposição aérea, temperaturas mais elevadas podem ter influenciado na expressão da AC no manto, como observado por Ren *et al* (2014) que demonstrou que a temperatura, pH e exposição aérea altera a expressão da AC no manto do bivalve *Hyriopsis cumingi*, sugerindo que AC pode participar na regulação do crescimento da concha, como apresentado por Marin & Luquet (2004).

Fatores Abióticos

A salinidade apresentou-se pouco variável nas diferentes marés e nas diferentes estações, demonstrando a estabilidade desse fator em ecossistemas marinhos como a praia do Cabo Branco, a qual não recebe aporte significativo de água doce provenientes de rios, salientando que os rios Gramame e Mamuaba, os quais poderiam exercer influência sobre a salinidade pelo seu aporte de água, ficam a aproximadamente 30km apresentando barragens, o que dificulta ainda mais o aporte de água doce provindos desses sistemas (Rosa *et al.*, s/a).

Em relação à turbidez, foi observado um aumento em maré alta e no inverno; dessa forma acreditamos que o aumento da turbidez d'água seja devido a mistura vertical sendo modulada pela velocidade dos ventos e não devido a pluviosidade, tendo em vista que no verão (mês de coleta) a quantidade de chuva foi maior que no mês de coleta no inverno (AESAs, 2016). Foi visto que TSS é bastante aumentado na área de estudo no ponto próximo a barreira, e assim como apresenta Reis *et al* (2008) a praia do Cabo Branco apresenta um alto grau de vulnerabilidade à erosão costeira, destacando-a como uma praia crítica quanto ao processo erosivo.

No verão obteve-se maiores temperaturas do ar e da água, provavelmente devido a maiores insolações. Assim como o fator abiótico, pH, foi maior no verão e nas marés altas, demonstrando águas mais básicas nessas condições em ecossistema costeiro como a área de estudo. O pH mais básico pode estar associado ao fato de a linha de costa de João Pessoa apresentar plataforma interna estreita, composta essencialmente por sedimentos carbonáticos (Reis *et al*, 2008), onde em temperaturas mais elevadas pode ter ocorrido aumento da dissociação do carbonato tornando a água mais básica.

CONCLUSÃO

Foi constatado que a exposição aérea exerce influência sobre a atividade da anidrase carbônica na hemolinfa, brânquia e manto. Sendo na hemolinfa possivelmente relacionado a processos respiratórios e de equilíbrio ácido-base, na brânquia possivelmente ligado a excreção de amônia e no manto relacionado a deposição de CaCO₃ na concha.

Ostras que ficam sempre submersas nas diferentes marés apresentam um padrão não variável na AAC da hemolinfa e tecidos.

O sedimento em suspensão de origem alóctone pode estar relacionado com a não regulação enzimática, entre maré alta e maré baixa, da AC na hemolinfa de ostras situadas na linha de praia

Ostras de recifes mais elevados as quais passam mais tempo em exposição aérea, apresentam menor índice de condição, possivelmente por apresentarem acidose respiratória prolongada e menor taxa de filtração.

Carbonic anhydrase activity of oyster *Crassostrea brasiliana* in natural conditions of tidal cycles and aerial exposure – a study on shore reefs

ABSTRACT

Carbonic anhydrase (CA) is a metalloenzyme present in several living organisms that catalyzes the reversible hydration of CO_2 in HCO_3^- and H^+ . It is essential in diverse physiological processes such as respiration, ionic transport, acid-base regulation and calcification. The aim of this study was to evaluate the influence of environmental factors such as tidal cycle and seasonality in the activity of CA (CAA) in hemolymph, gill and mantle of oysters *Crassostrea brasiliana*. Oysters were collected on shore reefs of Cabo Branco Beach in 3 points. Point 1 is a reef of intertidal zone closer to shoreline, point 2 is infralittoral zone, and point 3 is a reef more distant from shoreline. Oysters sampled in points 1 and 3 are exposed to air at low tide and submerged at high tide, while in point 2 are always submerged. Hemolymph, gill and mantle of individuals were collected *in situ* and transported to the laboratory for analysis of CAA. The results showed that seasonality and tidal changes affected mainly the hemolymph CAA. Thus, it was observed that air exposure has an influence on CAA of hemolymph, gill and mantle, and oysters suffering longer exposure time showed more variation on CAA and the worst condition index.

Keywords: Hemolymph. Gill. Mantle.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, F.A. & Chaplin, A.E. (1984). **Anaerobic metabolism of bivalve molluscs during exposure to air**. *Biochemical systematics and ecology*, 12 (1), 85-88.
- AESA – Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba. **Meteorologia – Chuvas. Paraíba**. (2016). [acesso em 4 de outubro de 2016] disponível em: <http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/monitoramentoPluviometria.do?metodo=listarMesesChuvasMensais>.
- Bedford, J. A & Lutz, P. L. (1992). **Respiratory physiology of *Aplysia californica* (J. E. Morton & C.M. Yonge, 1964) and *Aplysia brasiliana* (J. E. Morton & C.M. Yonge, 1964) upon aerial exposure**. *J. Exp. Mar. Biol. EcoL*, 155, 239-248.
- Booth, C.E., McDonald, D.G. & Walsh, P.J. (1984). **Acid-base balance in the sea mussel, *Mytilus edulis*. I. Effects of hypoxia and air-exposure on hemolymph acid-base status**. *Mar. Biol. Lett*, 5, 347-358.
- Bradford, M.M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Byrne, R. A., & McMahon, R. F. (1994). **Behavioral and physiological responses to emersion in freshwater bivalves**. *American Zoologist*, 34(2), 194-204.
- Child, A. R. & Laing, I. (1998). **Comparative low temperature tolerance of small juvenile European, *Ostrea edulis* L, and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thurnberg**. *Aquaculture Res*;29, 103–113.
- Cudennec, B. et al. (2006). **CGRP stimulates gill carbonic anhydrase activity in molluscs via a common CT/CGRP receptor**. *Peptides*, 27(11), 2678-2682.
- David, E. et al. (2005). **Response of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* to Hypoxia Exposure Under Experimental Conditions**. *The FEBS Journal* 272, Plounazé. 5635-5652.

Duvail, L., Moal, J. & Fouchereau-Peron, M. (1998). **CGRP-like molecules and carbonic anhydrase activity during the growth of *Pecten maximus***. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 120(3), 475-480.

Dwyer, J.J. & Burnett, L.E. (1996). **Acid-base status of the oyster *Crassostrea virginica* in response to air exposure and to infections by *Perkinsus marinus***. The Biological Bulletin, 190(1), 139-147.

Freeman, J.A. & Wilbur, K.M. (1948). **Carbonic anhydrase in molluscs**. The Biological Bulletin, 94(1), 55-59.

Gray, J. S. et al. (2002). **Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment**. Marine Ecology Progress Series. 238, 249–279.

Henry, R.P. (1988). **Multiple functions of gill carbonic anhydrase**. Journal Experimental Zoology. 248, 19–24.

Henry, R.P. (1991). **Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro**. In: Dodgson S.J., Tashian R.E., Gros G., Carter N.D. Eds. The carbonic anhydrase: cellular physiology and molecular genetics. Springer: New York. 119-126.

Henry, R.P. (1996). **Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism**. Annual Review of Physiology, 58(1), 523-538.

Ivanina, A. V., Sokolov, E. P. & Sokolova, I. M. (2010). **Effects of cadmium on anaerobic energy metabolism and mRNA expression during air exposure and recovery of an intertidal mollusk *Crassostrea virginica***. Aquatic Toxicology 99, 330–342.

Kraffe, E., et al. (2013). **Rapid mitochondrial adjustments in response to short-term hypoxia and re-oxygenation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas***. The Journal of Experimental Biology 216, 1561-1569.

Lee, J.H. et al. (2015). **Dietary ingestion of fine sediments and microalgae represent the dominant route of exposure and metal accumulation for Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*): A biokinetic model for zinc**. Aquatic Toxicology 167, 46–54.

Lionetto, M.G., et al. (2000). **Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium.** *Aquatic Toxicology* 48, 561–571.

Littlewood, D.T.J. (1989a). **Aquatic and aerial respiration of *Crassostrea rhizophorae*.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 93(4), 773-775.

Littlewood, D.T.J. (1989b). **Thermal tolerance and the effects of temperature on air-gaping in the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 93(2), 395-397.

Lucas, A., & Beninger, P. G. (1985). **The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture.** *Aquaculture*, 44(3), 187-200.

Marin, F. & Luquet, G. 2004. **Molluscan shell proteins.** *C. R. Pale* 3. 469-492.

Michaelidis, B., Haas, D., & Grieshaber, M. K. (2005). **Extracellular and Intracellular Acid-Base Status with Regard to the Energy Metabolism in the Oyster *Crassostrea gigas* during Exposure to Air.** *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(3), 373-383.

Nielsen, S.A. & Frieden, E. (1972). **Carbonic anhydrase activity in molluscs.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 41(3), 461-468.

Nixon, S.W. (1990). **Marine eutrophication: a growing international problem.** *Ambio* 19, 101.

Reis, C. M. M., Neumann, V. H. D. M. L., & de Lima, E. R. V. (2008). **Vulnerabilidade do litoral de João Pessoa (PB) à erosão costeira.** *Estudos Geológicos*, 18(2), 26.

Ren, G. et al. (2014). **Characterization of a novel carbonic anhydrase from freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii* and the expression profile of its transcript in response to environmental conditions.** *Gene* 546, 56–62.

Roegner, G.C. & Mann, R. (1995). **Early recruitment and growth of the American oyster *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae) with respect to tidal zonation and season.** *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 117(1), 91-101.

Rosa, C. R., Araujo, K. D., Pazera Jr, E., & Rosa, P. R. D. O. (s/a). **Contribuição climática para o deslizamento de encosta na falésia do Cabo Branco.**

Sadok, S., Uglow, R.F. & Haswell, S.J. (1999). **Some aspects of nitrogen metabolism in *Mytilus edulis*: effects of aerial exposure.** *Marine Biology*, 135(2), 297-305.

Spicer, J. I. (2014). **What can an ecophysiological approach tell us about the physiological responses of marine invertebrates to hypoxia?** *Journal of Experimental Biology*, 217(1), 46-56.

Sussarellu, R. et al. (2012). **Molecular and cellular response to short-term oxygen variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 412, 87-95.

Vitale, A.M. et al. (1999). **Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae).** *Comp. Biochem. Physiol.* 122(C), 121-129.

Wei, L. et al. (2015). **Combined metabolome and proteome analysis of the mantle tissue from Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to elevated pCO₂.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 13, 16–23.

Weihrauch, D., Wilkie, M.P. & Walsh, P.J. (2009). **Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans.** *Journal of Experimental Biology*, 212(11), 1716-1730.

Widdows, J. & Shick, J.M. (1985). **Physiological responses of *Mytilus edulis* and *Cardium edule* to aerial exposure.** *Marine Biology*, 85(3), 217-232.

Willson, L.L. & Burnett, L.E. (2000). **Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*.** *Journal of experimental marine biology and ecology*, 246(2), 223-240.

Zhang, G. et al. (2012). **The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation.** *Nature*, 490(7418), 49-54.