

Luciana Guzella

**EFEITO DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DO POLVO *Octopus vulgaris* TIPO II**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo
Coorientador: Dr. Carlos Rosas Vázquez (UNAM)

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Guzella, Luciana

Efeito da temperatura no desenvolvimento
embrionário do polvo *Octopus vulgaris* Tipo II /
Luciana Guzella ; orientador, Claudio Manoel
Rodrigues de Melo, coorientador, Carlos Rosas
Vázquez, 2018.

89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Tolerância Térmica. 3. Sistema
de Defesa Antioxidante. 4. Metabolismo. I. Melo,
Claudio Manoel Rodrigues de . II. Rosas Vázquez,
Carlos . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
IV. Título.

**Efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário do polvo
Octopus vulgaris Tipo II**

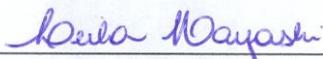
Por

LUCIANA GUZELLA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

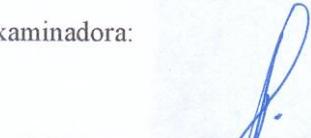
MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

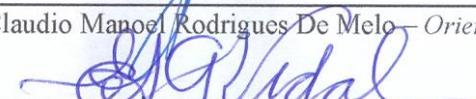


Profª. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

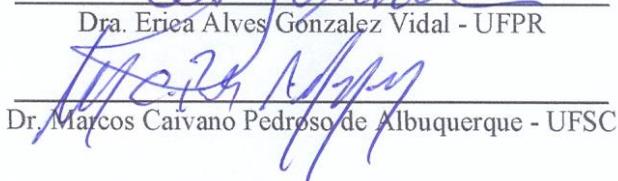
Banca Examinadora:



Dr. Claudio Manoel Rodrigues De Melo – *Orientador*



Dra. Erica Alves Gonzalez Vidal - UFPR



Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque - UFSC

Este trabalho é dedicado à melhor
pessoa do mundo, minha mãe *Janes* e
à sereia e rainha do mar *Iemanjá*.

AGRADECIMENTOS

*Por favô peço atenção
E que me escuite com cuidado
Vô cantá neste tabrado
Com viola, peito e emoção (...)
Eu venho de serra acima
Da zona do Contestado
Quem não gosta do meu canto
Me descurpa o desagrado
Mas não vou ficar calado
Que meu canto é uma missão
Que eu venho de serra acima
Da zona do Contestado*

Tenho muitos nomes a agradecer dentro da minha trajetória de “Contestada” na realização deste trabalho. Pessoas da academia e da vida, pessoas que acreditaram em mim por algum motivo, algum desassossego. Para começar a minha melhor amiga *Laís Eloá*, que me sacudiu de Caçador, onde fui cair de paraquedas no meio do caos do mundo. Ao meu amor, amigo e amante *Leonardo Kleba Lisboa*, que me faz acreditar em construir minha vida junto com a sua, por ser meu companheiro amado todos os dias, na luta e resistência. Aos seus pais, *Teresa Kleba e Armando Lisboa*, que me adotaram como filha.

À *Dra. Penélope Bastos Teixeira*, parceira e amiga de trabalho, minha referência como Mulher Pesquisadora, a quem dedico este trabalho e agradeço imensamente pela oportunidade de realizá-lo. À *Las Chicas* do Projeto Polvo, *Clara Luna de Bem Barreto Cano, Caroline Rodrigues, Ana Paula M. Gomes, Débora Rodrigues* e ao *José Julián Parra Solano*, todas foram fundamentais durante a manutenção dos polvinhos e realização do experimento em laboratório. E como se diz: “*uma andorinha só não faz verão*”, dedico este trabalho à esta bela equipe.

Ao Professor *Dr. Felipe do Nascimento Vieira* e toda a equipe do Laboratório de Camarões Marinhos pela estrutura física e operacional que viabilizou a manutenção dos polvos e realização do experimento de termotolerância. À Professora *Dra. Katt Regina Lapa* pelo apoio durante o processo de desenvolvimento das incubadoras.

Ao *Dr. Carlos Henrique Araujo de Miranda Gomes* e toda a equipe do Laboratório de Moluscos Marinhos que ajudaram direta e indiretamente nas diferentes etapas desta pesquisa. Ao *Luiz Ricardo da*

Silva que me ajudou à transportar uma fêmea de polvo até o Laboratório de Cultivo de Cefalópodes e Ecologia Marinha Experimental (UFPR). À Professora *Dra. Érica Alves González Vidal* e toda a sua equipe que ajudaram a cuidar desta fêmea, a qual dará um belo trabalho ainda a ser apresentado. Ao Professor *Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque* e toda a equipe do Laboratório de Moluscos Marinho da Unidade de Sambaqui pelo mexilhão ofertado como alimento aos polvos enquanto estiveram em laboratório.

Ao meu orientador *Dr. Claudio Manoel Rodrigues de Melo*, pela confiança e liberdade conferida a mim na realização deste estudo. Creio que esses dois sentimentos foram os alicerces que predominaram na construção deste trabalho. Estou muito grata por me apoiar, orientar, questionar e conduzir ao longo desses dois anos de orientação. Os seus questionamentos me estimularam e ampliaram meu pensamento para o debate científico, me despertaram para a criatividade e durante o experimento, me desafiaram em provar que ideias “malucas” podem dar certo. Esses são sentimentos que o *Orientador* deve despertar em sua *Aluna*. Tudo isso foi importantíssimo para eu alcançar o grau de “*Mestra*”. Muito obrigado por fazer parte da minha formação como aluna, acadêmica e profissional. E não pense que para por aqui...ainda temos muito trabalho pela frete!

Ao meu coorientador *Dr. Carlos Rosas*, por arrancar a minha alma, por despertar em mim o desejo pelo conhecimento, por me fazer acreditar em meu potencial, por me empoderar como pesquisadora, por me transformar numa pessoa apaixonada pela pesquisa. *Doc*, eu só tenho a lhe agradecer pela pessoa altruísta que é, pelo acolhimento e cuidado em minha estada no México, pelo aporte científico e metodológico no desenvolvimento deste trabalho. Não tenho palavras para agradecer a tudo que já fizeste por mim. Isso faz meu coração se encher de carinho, admiração e orgulho em tê-lo como *Tutor*. À sua esposa *Maria Eugenia Chimal*, grande Mulher, portadora de nobres virtudes, inteligente, justa, preocupada, amorosa, quem me acolheu e tornou-se minha amiga e meu porto seguro enquanto estive no México. À suas filhas *Afonsina* e *Gabi*, meninas de ouro, as quais compartilhamos momentos divertidos. Com muito amor, vocês são minha família mexicana.

À *Karen Ortega* e à Professora *Dra. Gabriela Rodríguez-Fuentes* por me ensinarem, ajudarem e viabilizarem as metodologias para as análises bioquímicas deste trabalho. À *Ms. Ariadna Sánchez* pela ajuda e ensinamento nas análises de metabólitos nesta pesquisa.

Ao Professor *Dr. Omar Hernando Avila-Poveda* e sua esposa *Ms. Quetzalli Yasú Abadia-Chanona* e sua mãe *Rose* que me acolheram em sua casa durante minha estada em Mazatlán, enquanto participava do Latin American & Caribbean Aquaculture.

À Professora *Dra. Aimê Rachel Magenta Magalhães* por aceitar-me como estagiária de docência.

À *Equipe Técnica*, às *Professoras* e *Professores* do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio e ensinamentos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de incentivo à pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce e ao *Ms. Fernando Dutra Brignol* pelo apoio durante as coletas e transporte dos polvos ao laboratório.

Às *Professoras* e *Professores* que compõe a banca examinadora.

Aos amigos e colegas unidos pelo curso.

Às amigadas feitas no México.

Aos amigos e colegas de bar.

Aos meus avós *Imelda* e *Albertino* por sempre encher minha geladeira de gostosuras saudáveis vindas do sítio. Ao meu irmão *Luis Alberto* por sempre me dar mochilas de presente, novas ou velhas, é o melhor presente que poderia receber de um irmão, espero sempre carregar bons livros nelas. Ao meu pai, *Luciano* que foi antes de termos maturidade suficiente para entender nossa relação, mas se tivesse aqui poderíamos nos construir juntos, livres e felizes. E por último a pessoa mais extraordinária do mundo e fundamental neste enredo, minha mãe *Janes Carmen*. Eu não estaria aqui hoje defendendo essa tese se não fosse por ela, pelo seu apoio, por seus exemplos e ensinamentos como pessoa, como mãe. Por toda nossa trajetória e história de vida que nos enriquece e une cada vez mais nossa relação de mãe e filha. Te amo, minha mãe.

*E agora vou retirando
Com viola acompanhado
Pra toda jagunçada
O meu abraço apertado
Ainda procuro um reduto
Onde se viva como irmão
E não conteste o Contestado
Sem saber sua razão.*

(O Contestado, Romário José Borelli)

– *Os reduto era uma festa e virô uma desgraça, como um dia pequeno que foi cortado por um temporá. Ano atraís de ano foro caíndo. Assim foro quatro ano de luita... Os reduto caíndo um depois do outro...*

– *Caiu Taquaruçu, Caraguatá virô tapera e Bom Sossego virô cinza...*

– *Caiu Santa Maria, Santo Amaro e Santa Rosa. O São José Maria não veio com o tempo pra acudi... Vô me escondê por aí. Se arguém pergunta, vô dizê que nem tive notiça de guerra.*

– *Adeodato! Vancê é o nosso úrtimo chefe e veja como nós tamo! Nós que chegemo a sê mais de cinco mir de uma só veis, num só lugá, tudo armado e embalado, agora não semo nem cinquenta... fraco, sem arma, desacorçoado... Tamo cercado por dentro e por fora...*

– *Tamo cercado... Aqui se costumava dizê que um home não morre quando tem companheiro. Mais agora os companheiro se arretiraro quase tudo, uns pras cova, sem nome e sem cruís, os otro se escondero ô se entregaro... é o fim. Meceis se espaiem se ainda dé. Que ninguém se arrependa do grito que deu, que foi bem dado. Eu, nascido e criado aqui nos mato, não sei dizê o que tá errado no mundo, que poco vi... mais alguma coisa tá muito errada. Se meceis que vão segui por aí, um dia pudé descobri e pudé consertá, se arreúna e conserte, que vale a pena. Vale a vida inté. Porque nós não semo bandido, nem matemo por gosto, porque pelo memo impurso e pela mesma ânsia nós enfrentemo o risco de morte, sofremo e morremo. Se um home se alevanta e diz “Vô morré se fô preciso”, pode não sê bonito, nem muito religioso, mais só acontece porque alguma coisa tá muito errada antes disso. Peço que vanceis me perdoe os grito e os comando de guerra, peço que vanceis se espaiem... pode se espaiá por aí, pode inté se entregá... mais não se renda por dentro, não se conforme.*

(Trecho retirado da obra teatral “O Contestado” do dramaturgo e diretor de teatro Romário José Borelli. Representa o discurso do último líder do Contestado, Adeodato Ramos, antes de ser preso e assassinado).

RESUMO

Os processos de maturação e desenvolvimento embrionário dos polvos são diretamente influenciados por fatores ambientais como a temperatura, a qual interfere na síntese de vitelo das fêmeas e modula os processos fisiológicos e metabólicos dos embriões. Alterações térmicas refletem proporcionalmente no sucesso do recrutamento de juvenis em ambiente natural, e na viabilidade das paralarvas em ambiente de cultivo. Temperaturas além dos limites térmicos provocam o estresse oxidativo, com a formação de espécies reativas de oxigênio, causando danos aos tecidos. Com base no modelo de tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio, e utilizando padrões fisiológicos como: I) bioindicadores do sistema de defesa antioxidante e enzimas lipídicas; II) indicadores metabólicos; III) taxas de crescimento morfométrico; este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário do polvo *Octopus vulgaris* Tipo II. Para isso, os embriões foram submetidos a dois tratamentos de temperatura: I) 18 °C constante; II) temperatura rampa, variando de 18 a 24 °C com incremento de 1 °C a cada 5 dias. De acordo com o comportamento termorregulador e a plasticidade metabólica apresentada pelos embriões, sugerimos que 18 °C seja o intervalo térmico em que os embriões experimentaram uma temperatura *pejus* (*pejus* em latim significa “piorando”, “prejuízo”). Os embriões expostos à temperatura 18 °C constante não conseguiram compensar o estresse térmico, que desencadeou num processo de resistência, com o funcionamento do sistema de defesa antioxidante até atingir condições térmicas críticas, quando o metabolismo aeróbio foi deprimido. Como consequência, os embriões mantidos neste tratamento apresentaram crescimento lento, irregular e subdesenvolvimento, com baixa taxa de eclosão e paralarvas morfometricamente deformes. No tratamento rampa até a temperatura de 22 °C, o crescimento dos embriões foi favorecido e o estresse térmico compensado, apresentando redução dos níveis de proteínas oxidadas. A partir da temperatura de 23 °C, o fornecimento de ATP foi reduzido e as defesas antioxidante aumentada, atingindo máxima atividade de proteção celular, sugerindo desta forma que 23 °C seja uma temperatura *pejus*. Na temperatura de 24 °C, o metabolismo dos embriões aumentou 94%, demonstrando falência do metabolismo aeróbio e inibição do sistema de defesa antioxidante, atingindo condições térmicas críticas na “faixa péssimo”. Neste trabalho, os embriões de ambos os tratamentos alcançaram condições térmicas críticas, seja pelo tempo de exposição à temperatura *pejus* ou através do aumento gradual da temperatura até

atingir a temperatura crítica, respectivamente, 18 e 24 °C. Isso sugere o possível intervalo térmico de desempenho que os embriões de *O. vulgaris* Tipo II estão adaptados (18-23 °C).

Palavras-chave: Aquicultura. Tolerância Térmica. Sistema de Defesa Antioxidante. Metabolismo.

ABSTRACT

The processes of maturation and embryonic development of the octopuses are directly influenced by environmental factors, such as temperature, which interfere in the synthesis of yolk of the female and modulate the physiological and metabolic processes of the embryos. Thermal changes reflect proportionately the success of the recruitment of juveniles in the natural environment and the viability of the paralarvae in the growing environment. Temperatures beyond the thermal limits provoke oxidative stress with the formation of reactive oxygen species, causing damage to the tissues. Based on the model oxygen- and capacity-limitations of thermal tolerance, and using physiological patterns such as: I) bioindicators of the antioxidant defense system and lipid enzymes; II) metabolic indicators; III) morphometric growth rates, this study aimed to evaluate the effect of temperature on the embryonic development of *Octopus vulgaris* Type II. For this, embryos were exposed to two temperature treatments: I) constant temperature 18 °C; II) ramp temperature, ranging from 18 to 24 °C with increment of 1 °C every 5 days. According to the thermoregulatory behavior and the metabolic plasticity presented by the embryos, the results suggest that 18 °C is the thermal interval where embryos experienced *pejus* temperature (*pejus* in Latin means "worsening", "injury"). Embryos exposed at constant temperature 18 °C failed to compensate the thermal stress, which triggered a process of resistance with the functioning of the antioxidant defense system until the critical thermal limit was reached, when the aerobic metabolism was depressed. As consequence, the embryos maintained in this treatment presented slow and irregular growth and underdevelopment, with low hatch rate and morphological deformed paralarvae. At the ramp temperature up to 22 °C, the growth of the embryos was favored and the thermal stress compensated, leading to a low level of oxidized proteins. From the temperature of 23 °C, the ATP supply was reduced and the antioxidant defenses increased, achieving maximum cellular protection activity, thus suggesting that 23 °C is a *pejus* temperature. At 24 °C, the embryos metabolism increased by 94%, demonstrating failure of aerobic metabolism and inhibition of the antioxidant defense system, reaching critical thermal conditions in the "worst range". In this study, the embryos of both treatments reached the critical thermal conditions, either by time of exposure to *pejus* temperature or through the gradual increase of the temperature up to the critical temperature, respectively,

18 and 24 °C. This suggests the possible thermal performance range that *O. vulgaris* Type II embryos are adapted to (18-23 °C).

Keywords: Aquaculture. Thermal Tolerance. Antioxidant Defense System. Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valor total das exportações de polvo (<i>Octopus</i> spp.) em âmbito nacional e regional entre os anos 2001-2009, abrangendo as regiões sul e sudeste do Brasil (Ávila-da-Silva <i>et al.</i> , 2014).	24
Figura 2. Produção mundial de polvo entre os anos de 1980 a 2010 (FAO, 2016a).	26
Figura 3. Registro das capturas de polvo no oeste da África entre os anos 1980-2010 (FAO, 2016a). Yagi <i>et al.</i> (2009) consideram de 1988 a 1998 máxima produção sustentável, entre 1999 e 2001 estágio de sobre-exploração e a partir de 2002 estoques reduzidos.	27
Figura 4. Distribuição geográfica do polvo <i>O. vulgaris</i> , reclassificado em cinco espécies pertencentes ao complexo <i>Octopus vulgaris</i> de espécies: <i>O. vulgaris sensu stricto</i> , Tipo I, Tipo II, Tipo III e Tipo IV (FAO, 2016a).	29
Figura 5. Representação esquemática das vias antioxidantes e defesas antioxidantes celulares (Regoli <i>et al.</i> , 2011b).	37
Figura 6. Representação esquemática do modelo de Tolerância Térmica Limitada pela Capacidade de Oxigênio, curva de performance térmica ou alcance aeróbio e capacidade de aclimação (Pörtner, 2010).	40
Figura 7 Desenho esquemático das unidades experimentais mantidas em recirculação para incubação dos ovos do polvo <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II. 1) Unidades experimentais. 2) Reservatório. 3) Motobomba de recalque. 4) Controlador de temperatura 5) Reator UV. 6) Filtro físico e biológico. 7) Aquecedor de titânio.	50
Figura 8 Representação das medidas efetuadas nos embriões de polvo <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II, onde EL é o comprimento do ovo, ETL é o comprimento total do embrião, ED é o diâmetro do olho, AL é o comprimento do braço, ML é o comprimento do manto. Saco vitelino interno e externo, <i>H</i> é o comprimento do saco vitelino e <i>D</i> é a largura do saco vitelino.	53
Figura 9 Efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário do polvo <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II. Embriões mantidos à temperatura 18 °C constante (círculos e linha preta) e temperatura rampa, variando de 18 a 24 °C com incremento de 1 °C a cada 5 dias (círculos e linha cinza). Estágios de desenvolvimento foram identificados segundo Naef (1928). n=350 embriões. Os parâmetros (intercepto e coeficiente angular) da equação de regressão são diferentes de zero (P<0,05).	56
Figura 10 Gráfico de estrela dos mecanismos antioxidante por estágio de desenvolvimento dos embriões de <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II expostos aos tratamentos de temperatura 18 °C constante (A) e temperatura	

rampa (18-24 °C) (B). Valores calculados para as respostas biomarcadoras integradas (IBR) (C) expressas em índice de atividade antioxidante ao longo da embriogênese entre os tratamentos 18 °C constante (círculos preto) e temperatura rampa (círculos cinza). Estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928).....	57
Figura 11 Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Concentrações de proteínas oxidadas (PO) (A), lipídeos peroxidados (LPO) (B) e atividade da acetilcolinesterase (AChE) (C) entre os tratamentos de temperatura 18 °C constante (círculos preto) e temperatura rampa (18-24 °C) (círculos cinza) ao longo do desenvolvimento embrionário do <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II. Valores de média e desvio padrão. Estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928).....	58
Figura 12 Gráfico de estrela dos indicadores metabólitos por estágio de desenvolvimento dos embriões de <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II expostos aos tratamentos de temperatura 18 °C constante (A) e temperatura rampa (18-24 °C) (B). Valores calculados para as respostas de biomarcadoras integradas (IBR) (C) expressas em índice de metabolismo no desenvolvimento embrionário entre os tratamentos 18 °C constante (círculos preto) e temperatura rampa (círculos cinza). Estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928).....	60
Figura 13 Análise de componentes principais (PCA) da morfometria dos embriões de <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II. Matriz de casos indicando a distribuição das variáveis em cada tratamento: 18 °C constante e temperatura rampa (18-24 °C) (A). n=350 embriões. Vetores das variáveis correlacionadas por Fator (B). Fator 1: ML -0,897, AL -0,841, YV 0,794, ETL -0,269, ED -0,023. Fator 2: ETL -0,927, ED -0,892, YV -0,466, ML -0,217, AL 0,112.....	62
Figura 14 Mudanças morfométricas após a organogênese nos embriões de <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II mantidos à temperatura 18 °C constante (barras pretas) e temperatura rampa (18-24 °C) (barras cinza). Valores de média e desvio padrão. n=132 embriões. Estágios de desenvolvimento descritos por Naef (1928). ANOVA Fatorial. Letras indicam estágios de desenvolvimento que apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey ao nível de 5%.....	64
Figura 15 Efeito da temperatura no volume de vitelo (mm ³) de embriões de <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II. Embriões incubados à temperatura 18 °C constante (círculos preto) e temperatura rampa (18-24 °C) (círculos cinza). Valores de média e desvio padrão. n=350 embriões. Estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928).....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise de regressão das características morfométricas dos embriões de *Octopus vulgaris* Tipo II entre os estágios de desenvolvimento para cada tratamento: 18 °C constante e temperatura rampa (18-24 °C). n=350 embriões. Slope das linhas de tendências: ns – não significativo. * significativo. Valores de média e desvio padrão. Anova One-way entre os tratamentos..... 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- OH – Radical Hidroxílico
- AChE – Acetilcolinesterase
- ADP – Adenosina Difosfato
- AL – Comprimento do Braço
- ATP – Adenosina Trifosfato
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CAT – Catalase
- CBE – Carboxilase
- CDM – Comprimento Dorsal do Manto
- CDNB – 1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno
- ChE – Colinesterase
- DHA – Ácido Graxo Docosaheptaenóico
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DNPH – 2,4-Dinitrofenilhidrazina
- DT-D – DT-Diaforase
- DTNB – Ácido 5,5'-Ditiobis (2 Nitrobenzenóico)
- ED – Diâmetro do Olho
- EL – Comprimento do Ovo
- EPA – Ácido Graxo Eicosaheptaenóico
- ETL – Comprimento Total do Embrião
- FAO – Food and Aquaculture Organization of the United Nations
- Fe²⁺ – Ferro Reduzido
- Fe³⁺ – Ferro Oxidado
- GPx – Glutathione Peroxidase
- GR – Glutathione Redutase
- GSH – Glutathione Total
- GSSG – Glutathione Oxidada
- GST – Glutathione-S-Transferase
- H⁺ – Prótons
- H₂O – Água
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- HQ – Hidroquinonas
- HSP – Proteína de Choque Térmico
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
- IBR – Respostas Biomarcadoras Integradas
- IN – Instrução Normativa
- IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change

LPO – Peroxidação Lipídica
LT – Limite de Temperatura
MDA – Malondialdeído
ML – Comprimento do Manto
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
 O_2^- – Íon Superóxido
 O_2 – Oxigênio
OCLTT – Tolerância Térmica Limitada pela Capacidade de Oxigênio
OD – Oxigênio Dissolvido
 P_c – Nível de Oxigênio Crítico
PCA – Análise de Componentes Principais
PNPA – 4-Nitrofenil Acetado
PO – Carboxilação de Proteínas
PSU – Unidade de Salinidade Prática
Q – Quinonas
RCF – Força Centrífuga Relativa
REDOX – Oxiredução
ROS – Espécie Reativa de Oxigênio
SDG – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
SEAP – Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República
SOD – Superóxido Dismutase
 T_p – Temperatura *Pejus*
TPC – Curva de Performance Térmica
UNAM – Universidade Nacional Autônoma do México
UV – Ultravioleta
YV – Volume do Vitelo
 ΔG° – Energia Livre

SUMÁRIO

1.1	INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1.1.1	Caracterização da Espécie	28
1.1.2	Efeito da Temperatura nos Processos Embrionários	32
1.1.3	Sistema de Defesa Antioxidante e Enzimas Lipídicas.....	35
1.1.4	Atividade Metabólica	38
1.2	OBJETIVO	41
1.2.1	Objetivo Geral	41
1.2.2	Objetivos Específicos	41
1.3	ESTRUTURA DO TRABALHO	42
2	CAPÍTULO ÚNICO	43
2.1	INTRODUÇÃO	45
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.2.1	Coleta de Adultos de <i>Octopus vulgaris</i> Tipo II.....	48
2.2.2	Delineamento Experimental.....	49
2.2.3	Sobrevivência na Eclosão	50
2.2.4	Sistema de Defesa Antioxidante e Atividade das Enzimas Lipídicas Acetilcolinesterase (AChE) e Carboxilase (CBE)	50
2.2.5	Metabólitos dos Embriões	52
2.2.6	Análise Morfométrica e Quantificação do Vitelo	52
2.2.7	Análise Estatística	53
2.2.7.1	Análise de desenvolvimento embrionário	53
2.2.7.2	Sistema de defesa antioxidante, enzimas lipídicas e metabólitos	54
2.2.7.3	Caracterização morfométrica e quantificação do vitelo	55
2.3	RESULTADOS	55
2.4	DISCUSSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS	72
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	79

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O polvo comum *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1727) é uma das espécies de cefalópodes mais estudadas no mundo, com ampla distribuição geográfica e grande relevância econômica. Esta espécie é altamente valorizada com interesses comerciais e gastronômicos no mercado mundial. Entretanto, o abastecimento deste produto vem exclusivamente da pesca artesanal ou industrial (Iglesias *et al.*, 2014; Vidal, 2014; FAO, 2016a).

As tecnologias de cultivo disponíveis para a espécie *O. vulgaris* ainda são escassas, sendo possível obter o seu ciclo de vida completo apenas em escala laboratorial. Por esse motivo, o sistema de cultivo existente consiste exclusivamente na captura e engorda de indivíduos selvagens, como é realizado comercialmente na Espanha. Este sistema é constituído por gaiolas flutuantes, contendo abrigos individuais, presas em balsas, no qual polvos subadultos (>1,0 kg) são mantidos com dieta natural de baixo custo (Iglesias *et al.*, 2014). Desta forma, pode-se obter ciclos produtivos a cada 3-4 meses com polvos em tamanho comercial de 2,5-3 kg e taxa de sobrevivência de até 85-90% (Iglesias *et al.*, 2000).

No entanto, esta atividade é influenciada pelas condições ambientais de salinidade e temperatura, que podem reduzir o desempenho zootécnico do polvo. Outros fatores como flutuações nas capturas de juvenis para a engorda e o ciclo reprodutivo da espécie também afetam negativamente esta produtividade (Chapela *et al.*, 2006). Assim, a aquicultura existente para a espécie continua dependente de capturas, tanto para o povoamento das unidades de cultivo, quanto para o fornecimento das dietas, reduzindo a viabilidade econômica e operacional da atividade (Iglesias *et al.*, 2014). Esses são alguns dos motivos que justificam a queda no setor produtivo na Espanha, onde a engorda comercial de polvos reduziu de 30 t em 2008 para 1 t em 2016 (FAO, 2018).

No Brasil, as capturas de *O. vulgaris* são realizadas por frotas comerciais principalmente nas regiões sul e sudeste, compondo quase a totalidade da produção (Ávila-da-Silva *et al.*, 2014). Até os anos 2000, a produção nacional de polvo se dava basicamente pela pesca de arrasto de fundo, sendo o polvo fauna acompanhante nas pescarias de camarão (Grassi *et al.*, 1976; Costa e Haimovici, 1990; Gasalla *et al.*, 2005). Recentemente, com a redução das capturas de espécies tradicionais e crescente demanda de mercado, o polvo passou a ser mais valorizado como recurso pesqueiro (FAO, 2016a).

Entre os anos 1970 e 1980, ocorreram diversas tentativas de viabilizar a pesca nacional de polvo por meio de espinheis com potes de barro, o que demonstrou ser pouco prático e inviável economicamente. Além disso, ocorreram dificuldades tecnológicas na exportação deste produto ao Mediterrâneo, considerado um dos maiores polos consumidores na época. Somente em 2003, a produção tornou-se comercialmente viável no estado de São Paulo, após os potes de barro serem substituídos por potes de plástico (Tomás e Ávila-da-Silva, 2011; Assunção, 2012; Ávila-da-Silva *et al.*, 2014). Dois anos depois a atividade chegou ao estado de Santa Catarina, com desembarques pesqueiros registrados por 3 embarcações. No ano de 2008, as frotas licenciadas neste estado aumentaram de 3 para 21 embarcações, contabilizando produção total de 751 t. No mesmo período, as capturas de polvo no estado de São Paulo atingiram produção máxima de 1.118 t. Nos anos subsequentes, os registros apresentaram queda acentuada, com redução de 60-70% de produtividade nestas regiões (Figura 1) (Archidiacono, 2007; Castanhari, 2007; Assunção, 2012; Ávila-da-Silva *et al.*, 2014).

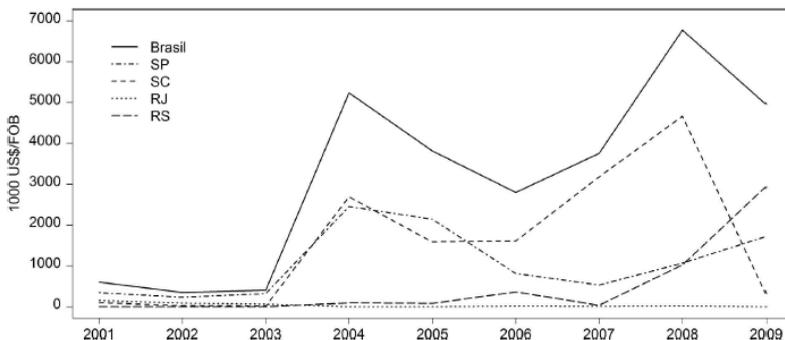


Figura 1. Valor total das exportações de polvo (*Octopus* spp.) em âmbito nacional e regional entre os anos 2001-2009, abrangendo as regiões sul e sudeste do Brasil (Ávila-da-Silva *et al.*, 2014).

O ordenamento pesqueiro e aquícola brasileiro é fomentado, regulamentado, licenciado e fiscalizado pela Secretaria de Aquicultura e Pesca, vinculada ao Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços através do Decreto n° 9.004, de 13 de março de 2017, onde dispõe da Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, segundo a Lei n° 11.959, de 29 de junho de 2009.

Os critérios regulamentadores para captura de polvo (*Octopus* spp.) no Brasil, sob jurisdição em águas marinhas nas regiões sul e sudeste, estão expressos na Instrução Normativa SEAP nº 26, de 19 de dezembro de 2008, que estabelece regras para o exercício da atividade, como: o limite de frota por região, a quantidade de potes por embarcação (máximo 20 mil), a profundidade mínima permitida de operação (70 m), e o tamanho do polvo para captura (>11 cm de comprimento dorsal do manto (CDM)). Porém, Ávila-da-Silva *et al.* (2014) relataram problemas no cumprimento destas regras, principalmente no que diz respeito ao número de embarcações clandestinas exercendo a atividade, em conjunto com a dificuldade de se fiscalizar o número de potes contido nas embarcações. Segundo Teixeira (2011), outra problemática enfrentada durante as capturas é a inviabilidade de se realizar a biometria em polvos vivos, pois a legislação (IN SEAP nº 26/2008) preconiza que o tamanho do polvo para captura seja superior a 11 cm de CDM. Desta forma, a autora sugere que seja utilizado como parâmetro para captura o peso total do polvo ao invés do CDM, tornando-se mais prática e eficiente a triagem dos animais, preservando os juvenis em estágios de maturação.

A fiscalização pesqueira sob jurisdição nacional é realizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), regulamentada pelo Decreto nº 3.179, de 21 de setembro de 1999, revogado pelo Decreto nº 6.514, de 22 de julho de 2008.

O último boletim estatístico informando a produtividade pesqueira de polvo no Brasil foi divulgado pelo extinto Ministério de Estado da Pesca e Aquicultura em 2011 (Hazin *et al.*, 2011), o qual demonstra de forma genérica as capturas de polvo (*Octopus* spp.) com aproximadamente 2.100 t.ano⁻¹, mantendo-se estável de 2009 a 2011. Neste relatório, os registros de exportação e importação categorizados como “Moluscos” se mantiveram inexpressivos, apresentando respectivamente taxas de 1 e 2%.

Segundo a FAO (2016a), a produção mundial de polvo em 2010 ultrapassou 550.710 t, o dobro da produção registrada nos anos 1980 (Figura 2). Em 2009, a exportação de polvo foi avaliada em US\$ 1,07 bilhões de dólares, enquanto o valor das importações atingiram US\$ 1,33 bilhões. O valor comercial do polvo excedeu a cotação de muitos peixes, passando a ser considerado como recurso pesqueiro valioso.

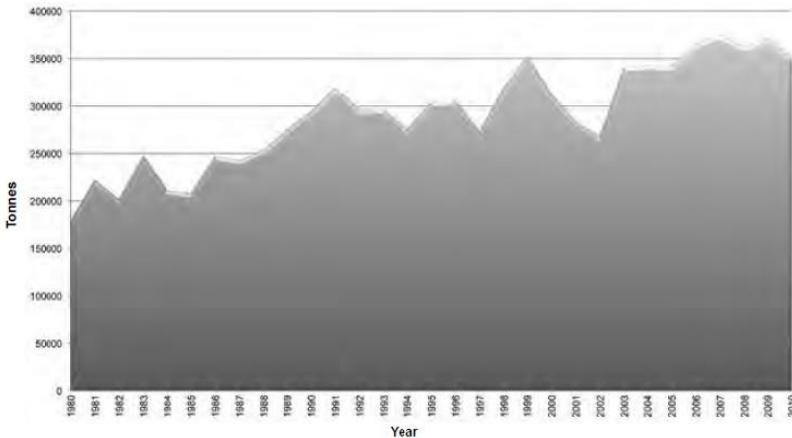


Figura 2. Produção mundial de polvo entre os anos de 1980 a 2010 (FAO, 2016a).

Na América Latina, a pescaria de polvo superou 31.000 t em 2010, sendo o México maior produtor com 21.000 t, seguido do Brasil com 2.000 t. Em âmbito mundial, os maiores consumidores de polvo, conseqüentemente, os maiores importadores de cefalópodes, são Espanha, Itália e Japão, enquanto Marrocos, Mauritânia e China são os maiores exportadores de polvo. Entre os anos 2014-2015, a regulação de mercado sustentada por commodities registrou aumento do consumo mundial de polvo com redução do seu valor para comercialização. Estatísticas da FAO listam os desembarques de polvo apoiado em quatro principais espécies: *O. vulgaris*, *Octopus maya*, *Eledone cirrosa* e *Eledone moschata* (FAO, 2016a, 2016b).

As maiores capturas concentram-se na espécie *O. vulgaris*, apresentando maior produção no noroeste da África, principalmente em Senegal, Mauritânia e Marrocos. Considerando os registros pesqueiros no oeste africano, a Figura 3 demonstra claramente reduções no setor produtivo, passando de 137.000 t na década de 1990 para 49.000 t nos anos 2010. Baseado nestes registros e utilizando modelos estatísticos e econômicos, alguns autores avaliaram que o aumento da pressão de pesca leva à redução na abundância dos estoques, com populações compostas cada vez mais por indivíduos jovens, dependentes de recrutamento e suscetíveis às mudanças ambientais (Gascuel *et al.*, 2007; Yagi *et al.*, 2009; FAO, 2016a).

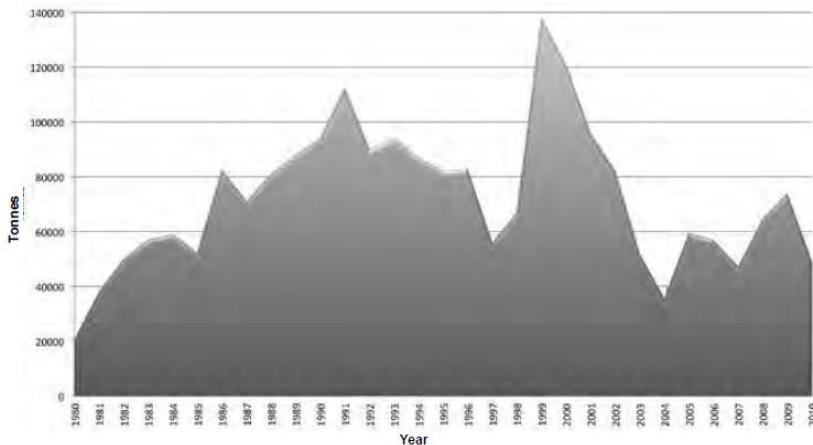


Figura 3. Registro das capturas de polvo no oeste da África entre os anos 1980-2010 (FAO, 2016a). Yagi *et al.* (2009) consideram de 1988 a 1998 máxima produção sustentável, entre 1999 e 2001 estágio de sobre-exploração e a partir de 2002 estoques reduzidos.

Ao pensar na sobre-exploração do polvo como recurso pesqueiro em âmbito nacional e mundial (Yagi *et al.*, 2009; Ávila-da-Silva *et al.*, 2014; FAO, 2016a), e refletir sobre as possíveis mudanças que podem ocorrer na dinâmica populacional dos organismos marinhos dentro de um cenário de alterações climáticas (IPCC, 2013; Stuart-Smith *et al.*, 2015; Vinagre *et al.*, 2016); surge a necessidade urgente de fornecer informações que ajudem no desenvolvimento de tecnologias que viabilize a aquicultura da espécie *O. vulgaris*, sendo esta usada como medida mitigadora à manutenção dos estoques naturais e abastecimento do mercado consumidor com este produto.

Dentre as espécies alvo de cefalópodes com potencial para diversificar a maricultura, o polvo *O. vulgaris* apresenta características zootécnicas favoráveis com alta fecundidade, ciclo de vida curto, eficiente conversão alimentar, fácil adaptação ao cultivo e rendimento corporal para produção de alimento superior a 90% (Vaz-Pires *et al.*, 2004). Assim, é fundamental desenvolver inovações tecnológicas que assegurem a produção aquícola sustentável de juvenis em escala comercial, promovendo a engorda comercial em gaiolas flutuantes, visto os resultados promissores obtidos pela atividade (Bastos *et al.*, 2014; Iglesias *et al.*, 2014), aprimorando a cadeia produtiva do polvo.

1.1.1 Caracterização da Espécie

O polvo *O. vulgaris* é uma espécie nerítica, bentônica, que ocorre ao longo da plataforma continental até a costa, considerada espécie cosmopolita com distribuição no Mar Mediterrâneo, Oceano Atlântico Oriental, Ilhas Açores, Canárias e Cabo Verde, Mar do Caribe, norte da América do Sul, Oceano Atlântico Sul, Oceano Índico, Ásia Leste e África do Sul (Figura 4). Habitam profundidades até 200 m em substratos rochosos, arenosos, recifes de corais ou com plantas. Possuem hábitos noturnos passando grande parte do dia escondidos em abrigos permanentes ou temporários, com longevidade estimada de dois anos. São considerados predadores oportunistas, alimentando-se de uma grande variedade de presas como peixes, crustáceos e moluscos, podem praticar canibalismo e raramente são detritívoros. Ao mesmo tempo, também são predados facilmente por peixes como garoupa, enguias e tubarões. Em ambiente de cultivo, adaptam-se rapidamente aceitando alimento congelado como crustáceos, moluscos e peixes (Iglesias *et al.*, 2014; Vidal, 2014; FAO, 2016a).

Dentro do nome da espécie *O. vulgaris*, atualmente existem outras quatro espécies distintas, morfologicamente semelhantes, com distribuição geográfica em águas tropicais, subtropicais e temperadas ao redor do mundo. Todas as espécies possuem características reprodutivas, embrionárias e paralarvais correspondentes, com ampla capacidade de dispersão e importância de captura. Entretanto, a taxonomia da espécie permanece incerta. Baseado em marcadores genéticos e morfológicos a espécie foi reclassificada em cinco grupos denominado parte do complexo *Octopus vulgaris* de espécies, sendo elas: *Octopus vulgaris sensu stricto*, Tipo I, II, III e IV (Figura 4). Assim, cada grupo possui diferenças específicas fundamentadas na plasticidade fenotípica e adaptação às condições ambientais, como intervalos distintos de temperaturas tanto no desenvolvimento embrionário quanto nos estágios plantônicos iniciais do ciclo de vida (Cabranes *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2010; FAO, 2016a; Amor *et al.*, 2017).

O ciclo de vida completo do *O. vulgaris* sob condição de cultivo foi fechado pela primeira vez no ano de 2001 em laboratório (Iglesias *et al.*, 2004). Após vários anos de trabalho, hoje é possível obter ovos fertilizados viáveis através da captura de indivíduos selvagens, mantendo machos e fêmeas em laboratório.

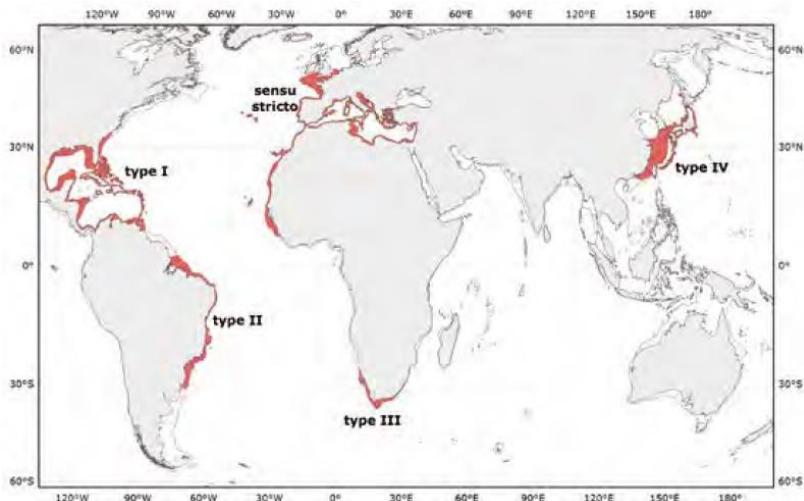


Figura 4. Distribuição geográfica do polvo *O. vulgaris*, reclassificado em cinco espécies pertencentes ao complexo *Octopus vulgaris* de espécies: *O. vulgaris sensu stricto*, Tipo I, Tipo II, Tipo III e Tipo IV (FAO, 2016a).

O comportamento reprodutivo do polvo é caracterizado por paternidade múltipla com apenas um período de maturação sexual (semalpáticos), desova única e postura parcelada, podendo prolongar-se por vários dias. Desta forma, são identificados diferentes estágios de desenvolvimento em uma única massa de ovos. Os ovos são colocados em abrigos sob a forma de penca, contendo várias centenas de ovos cimentadas em algum substrato. Durante a embriogênese, as fêmeas demonstram cuidado parental, mantendo a limpeza e ventilação dos ovos, diminuindo a ingestão de alimento até a inanição e morrem após a eclosão (Boletzky, 1989; Boyle e Rodhouse, 2005; Silva, 2006; Iglesias *et al.*, 2007; Teixeira, 2011; Iglesias *et al.*, 2014; Vidal, 2014).

Uma fêmea desta espécie possui alta fecundidade, produzindo entre 100.000 a 500.000 ovos (Mangold, 1983). A relação entre ovos.fêmea⁻¹ está associada ao seu tamanho, onde uma fêmea pode desovar aproximadamente 100.000 ovos.kg⁻¹ de peso corporal (Iglesias *et al.*, 1997). Diferente do que é observado em fêmeas de outras espécies do mesmo gênero, as quais apresentam diferente estratégia reprodutiva como ovos maiores e fecundidade menor, por exemplo, as desovas do *O. maya* com até 2.000 ovos (Rosas *et al.*, 2014) e do *Octopus minor* entre 9-125 ovos (Iglesias *et al.*, 2014; FAO, 2016a). A vantagem de se

cultivar estas espécies é a ausência da fase plantônica, emergindo do ovo uma paralarva holobentônica.

Os polvos são animais gonocóricos com diferenciação sexual durante o desenvolvimento. No entanto, o dimorfismo sexual externo é visualizado somente no estágio subadulto (Boletzky, 1989). O aparelho reprodutor das fêmeas de *O. vulgaris* não possui glândula nidamental, cada oviduto conectado ao ovário tem igualmente uma glândula oviducal (Guerra, 1975). O órgão copulador nos machos (hectocótilo) apresenta-se no terceiro braço direito, o qual possui um canal espermatofórico com terminação arredondada para facilitar a fertilização. Através deste, ocorre a transferência dos espermatozoides para o interior da cavidade do manto da fêmea. Fêmeas imaturas sexualmente podem armazenar os espermatozoides em espermatecas, que são cavidades especializadas nas glândulas oviducalis, até adquirirem a maturidade sexual, caracterizando fecundação interna (Mangold e Boletzky, 1973; Mangold, 1983; Boletzky, 1989; Boyle e Rodhouse, 2005; Iglesias *et al.*, 2014; Vidal, 2014). Outro dimorfismo sexual visualizado nos machos desta espécie, são as ventosas 15 e 17 do segundo e terceiro par de braços, as quais possuem tamanho maior que as demais (Teixeira, 2011).

Os estágios de desenvolvimento embrionário do *O. vulgaris* foram identificados por Naef (1928), sendo descritos em XX estágios passo a passo, que compreendem desde as primeiras divisões celulares até a eclosão. Durante a embriogênese, os embriões invertem sua posição duas vezes.

A primeira fase ontogenética é determinada pelo aumento do número de células (blastômeros), compreendendo os estágios de 0-I. Nestes estágios ocorrem segmentações do tipo meroblástica discoidal, formando um blastodisco sobre um dos polos da massa de vitelo, característico de ovos telolécitos, no caso dos cefalópodes (Boletzky, 1989, 2003).

A gastrulação (estágios II-VII) se inicia com um movimento de deformação, sendo observado o aumento do número de células em duas populações. A camada interna do blastodisco cresce em direção ao centro formando a mesentoderme. Na parte central, forma-se a ectoderme que cresce para a periferia da mesentoderme, enquanto a parte mais periférica, blastoderme, avança sobre a massa de vitelo em direção ao polo oposto, formando o saco vitelino. Logo, ocorre a formação de três folhetos embrionários, mais o intestino primitivo e o blastóporo, que comunica o intestino primitivo ao ambiente externo dando origem a boca (Boletzky, 1989, 2002, 2003; Silva, 2006).

A primeira inversão do embrião (estágio VIII) marca o começo da organogênese, dando início dos processos morfogênicos que levam à diferenciações nas áreas dos órgãos e surgimento de órgãos rudimentares. Nos estágios iniciais a pulsação do saco vitelino funciona como reserva nutricional e superfície respiratória. À medida que o embrião cresce, o vitelo é claramente dividido em saco vitelino interno e externo, conectado pela cavidade da boca. O início da atividade cardíaca e do sistema circulatório caracteriza o fim da organogênese (estágios XV-XVI). Os próximos estágios de desenvolvimento são definidos pelo crescimento linear do embrião e diferenciações histológicas, com estimulações mecânicas e atividade dos cromatóforos. Ao final, o embrião volta à posição inicial (estágio XIX) estando pronto para eclodir (estágio XX) (Boletzky, 1989, 2002, 2003; Mangold, 1983; Castro-Fuentes *et al.*, 2002; Boyle e Rodhouse, 2005; Iglesias *et al.*, 2014; Sánchez García, 2016).

Durante o desenvolvimento embrionário as necessidades nutricionais são fornecidas pelo vitelo. Mesmo após a eclosão, as paralarvas mantêm reserva de vitelo no estômago, fornecendo energia nos primeiros dias de vida, onde combinam alimentação endógena e exógena até a dependência completa por alimento exógeno (Moguel *et al.*, 2010; Vidal, 2014). Morfológicamente entre a eclosão, a fase paralarval e adulta não há qualquer metamorfose. Por isso, considera-se desenvolvimento direto, eclodindo do ovo um adulto em miniatura com requisitos ecológicos distintos entre uma fase plantônica e bentônica (Boyle e Rodhouse, 2005).

Atualmente um dos entraves ao cultivo de *O. vulgaris* está relacionado diretamente com a nutrição e a padronização de sistemas que garantam desempenho zootécnico e sobrevivência das paralarvas. As altas exigências nutricionais em ácidos graxos, fosfolípidos e colesterol, além de aminoácidos como lisina, leucina e arginina, e nutrientes essenciais como cobre, têm influenciado nas baixas taxas de sobrevivência. Vários autores conseguiram resultados importantes utilizando dietas com zoea de crustáceos e *Artêmia* enriquecida, em diferentes sistemas. No entanto, ainda faltam informações para compreender melhor questões nutricionais, fisiológicas e comportamentais das paralarvas. A disponibilidade de alimento para cultivar paralarvas em maior escala também tem desafiado os pesquisadores, visto que *Artêmia* é o único alimento com fácil acesso (Iglesias *et al.*, 2004, 2007).

Outro obstáculo ao cultivo é a produção viável de paralarvas com qualidade, diretamente ligado ao controle de reprodutores, maturação e

desenvolvimento embrionário adequado. A quantidade e qualidade dos ovos dependem diretamente de influências ambientais durante o processo de maturação e embriogênese, sendo a temperatura um dos parâmetros mais importantes, pois regula os processos metabólicos, morfológicos e fisiológicos dos embriões (Repolho *et al.*, 2014; Iglesias *et al.*, 2014; Vidal, 2014; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016; Juárez *et al.*, 2016; Uriarte *et al.*, 2012, 2016; Sanchez-García *et al.*, 2017).

1.1.2 Efeito da Temperatura nos Processos Embrionários

Os processos embrionários são extremamente dependentes da temperatura, podendo acelerar ou retardar o tempo de desenvolvimento dos embriões, determinando as condições de sobrevivência e crescimento das paralarvas (Boletzky e Hanlon, 1983; Boletzky, 1989, 1994; Boyle e Rodhouse, 2005). Esta relação foi corroborada por Mangold e Boletzky (1973) quando ovos de *O. vulgaris* foram submetidos às temperaturas constantes de 13, 15, 20 e 25 °C, demonstrando que o tempo de desenvolvimento dos embriões variou de 23 a 125 dias, o que corresponde ao intervalo térmico durante o período de desova da espécie na costa do Mar Mediterrâneo Sul na França (Banyuls-sur-Mer).

Caverivière *et al.* (1999) também avaliaram o tempo de desenvolvimento de embriões de *O. vulgaris*, mantendo fêmeas com desova em laboratório e em ambiente natural na costa de Senegal, onde encontraram os seguintes relações de tempo e temperatura: 15-42 dias à temperatura média de 27 °C (26-27,6 °C), 29-49 dias entre 22-23 °C (variação de 20-26 °C), 57-65 dias a 21 °C (20-22,5 °C), 65-74 dias à temperatura média de 18,8 °C (variação de 14-23 °C) e 80-87 dias a 17 °C (14-19 °C). Com estes resultados, os autores sugerem que a variação no tempo de desenvolvimento pode representar diferentes espécies pertencentes ao complexo *O. vulgaris* de espécies, com adaptações térmicas entre o gradiente latitudinal.

Considerando a temperatura um fator modulador do desenvolvimento embrionário, Uriarte *et al.* (2016) experimentaram reduzir o tempo de incubação dos ovos do polvo vermelho da Patagônia *Enteroctopus megalocyathus*, a fim de viabilizar seu cultivo. Para isso, incrementaram 1 e 2 °C acima do intervalo térmico de distribuição da espécie em ambiente natural (12-14 °C), mantendo os embriões a quatro temperaturas constantes: 12, 14, 15 e 16 °C. O incremento de temperatura viabilizou maiores taxas de crescimento mantendo o desempenho zootécnico dos embriões, com redução de 15% do período

de incubação dos ovos quando comparado aos embriões mantidos à temperatura de 12 °C. Embora, esses resultados sejam positivos, é evidente que os embriões dependam de ajustes fisiológicos e bioquímicos para compensar incrementos de temperaturas dentro dos limites térmicos que evoluíram (Clarke, 2003).

Sabe-se sobre o polvo *O. maya*, espécie com produção semipiloto na Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM), que o limite térmico para desova é abaixo de 27 °C, sendo recomendado que as fêmeas fertilizadas sejam mantidas a 24 °C. O estresse térmico durante o período de maturação interfere no desempenho das novas gerações de juvenis porque a temperatura afeta a síntese de vitelo, reduzindo a taxa de crescimento e sobrevivência da prole. Durante o desenvolvimento embrionário recomenda-se que os ovos sejam mantidos entre as temperaturas de 22-26 °C, pois descreve o melhor desempenho zootécnico dos embriões. Tais temperaturas refletem as condições ambientais da Península de Yucatán, habitat desta espécie endêmica (Juárez *et al.*, 2015, 2016; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016).

Para cada espécie de polvo existe uma faixa ideal de temperatura, as quais não afetem o desenvolvimento dos embriões, visto que, os estágios ontogênicos iniciais são os mais sensíveis do ciclo de vida (Repolho *et al.*, 2014), e determinam o recrutamento de juvenis e distribuição das populações no ambiente (Vidal, 2014). Com os avanços tecnológicos em metodologias de análises, hoje podemos avaliar com maior riqueza de detalhes o efeito da temperatura nos processos embrionários, fornecendo informações que possam descrever fisiologicamente os limites de temperatura que os embriões podem tolerar.

Repolho *et al.* (2014) em Portugal investigaram quais foram os efeitos da temperatura quando embriões de *O. vulgaris sensu stricto* foram submetidos ao estresse térmico. Como esperado, embriões incubados a 21 °C (+3 °C correspondente à temperatura futura de aquecimento dos oceanos) eclodiram após 25 dias de incubação, com taxa de sobrevivência 30% menor e 17,8% de paralarvas prematuras. Diferentemente dos embriões mantidos a 18 °C, que apresentaram 100% de sobrevivência e eclodiram após 38 dias de incubação. O tamanho dos embriões também foi inverso ao incremento de temperatura, com concentrações de HSP70 (proteína de proteção ao choque térmico) e glutathione-S-transferase (GST) significativamente maiores nos estágios avançados da embriogênese e nas paralarvas, com aumento de malondialdeído (MDA) indicando lesões celulares. Assim, o aumento das exigências metabólicas provocado pelo aumento da temperatura leva

a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e maiores concentrações de lipídeos peroxidados (MDA), por isso os embriões não conseguem tolerar temperatura acima de seus limites térmicos.

Rosa *et al.* (2012) também buscaram respostas a partir de uma visão integrada dos efeitos da temperatura na ontogenia inicial da lula *Loligo vulgaris*. Os embriões foram submetidos à temperaturas de verão e inverno da costa portuguesa 13 e 17 °C, com incremento de 2 °C considerando o futuro aquecimento dos oceanos para cada estação, 15 e 19 °C. No cenário de aquecimento de verão, o desenvolvimento dos embriões foi encurtado negativamente com taxa de sobrevivência de 70%, exibindo deformidades como manto subdesenvolvido, dimorfismo ocular e paralarvas prematuras. Os níveis de GST, catalase (CAT), MDA, superóxido dismutase (SOD) e HSP70 foram significativos nas paralarvas quando expostas a 19 °C, com temperaturas letais LT50 e LT100 significativas tanto para os embriões quanto para as paralarvas a esta temperatura. Os pesquisadores indicam que as eclosões prematuras estão relacionadas ao estresse hipóxico e à supressão metabólica, pois a exigência energética excede a demanda de oxigênio disponível nos tecidos. Ainda, o aumento metabólico elevou os níveis de ROS e lipídeos peroxidados, combinado com inibição da atividade antioxidante, provocou as más formações nos embriões. Logo, os limites térmicos estão associados à oferta de oxigênio e aos mecanismos fisiológicos de compensarem as ROS.

Utilizando uma metodologia inovadora, pesquisadores da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM) examinaram o aumento gradual de temperatura no crescimento, metabolismo respiratório e defesa antioxidante dos embriões de *O. maya*. Assim, descobriram que o limite térmico máximo para embriões desta espécie é 27 °C, mesma temperatura limite para maturação e desova das fêmeas (Juárez *et al.*, 2015). Acima desta temperatura o metabolismo aumentou 13% em comparação ao grupo mantido a 24 °C constante, com aumento de 63% da frequência respiratória acima dos 27 °C. Os embriões apresentaram alterações no diâmetro do olho e ativação da enzima acetilcolinesterase (AChE), indicando alterações no sistema nervoso estimulado pelo aumento da temperatura. Até 27 °C, os embriões apresentaram mecanismos fisiológicos para compensar as demandas metabólicas e os efeitos oxidativos, acima desta temperatura os danos celulares foram irreversíveis. Isso sugere que os embriões possuem reduzida plasticidade térmica, pois estão envolvidos na formação dos tecidos e tal estresse limita os mecanismos antioxidantes que controlam

as ROS produzidos pelas altas taxas metabólicas (Sanchez-García *et al.*, 2017).

1.1.3 Sistema de Defesa Antioxidante e Enzimas Lipídicas

As progressivas espécies reativas de oxigênio (ROS) provocadas pelo incremento de temperatura levam ao estresse oxidativo (Vinagre *et al.*, 2016), causando danos aos lipídios, proteínas, disfunção celular e apoptose da célula (Regoli e Giuliani, 2014). A produção de ROS se dá quando os processos metabólicos são aumentados devido às mudanças ambientais, que tem como consequência maior consumo de oxigênio. O oxigênio, utilizado como último acceptor de elétrons da cadeia respiratória é liberado na matriz mitocondrial, formando os ROS. No processo de obtenção de energia (fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons) participam, além do oxigênio (O_2), várias enzimas oxidativas finais ou intermediárias que são ativadas na membrana interna da mitocôndria. Como consequência do metabolismo aeróbio, íons superóxidos ou peróxidos reativos (O_2^- , O_2^{2-} , H_2O_2 , $\bullet OH$) se combinam formando outras moléculas (HOONO, HOCl, ROO \bullet , RO \bullet), que se diferem em termos de reatividade e danos aos lipídeos, proteínas e DNA. Por essa razão, o acúmulo de ROS tem sido associado com o processo de envelhecimento. Para neutralizar este efeito, as células aeróbias desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante (Regoli *et al.*, 2011a, 2011b).

O sistema antioxidante é caracterizado por vários eliminadores de baixo peso molecular e defesa enzimática que integram uma cascata de reações (Figura 5), com efeitos diretos ou indiretos, neutralizando os ROS ou oxidando-os a outro radical. Os eliminadores são moléculas hidrofílicas, por isso não são ativados de forma sincronizada, mostrando diferente sensibilidade de ativação, sendo alguns induzidos e outros deprimidos (Regoli *et al.*, 2011a, 2011b; Regoli e Giuliani, 2014).

As defesas antioxidantes são conhecidas pela capacidade resposta às alterações ambientais, podendo ser utilizadas como biomarcadores. As reações moleculares refletem mudanças nas funções enzimáticas trazendo efeito intracelular metabólico e biotransformador, como modificação pós tradução de proteínas. Isso sugere a complexidade das respostas conforme a exposição ambiental e a regulação ao estresse oxidativo, que pode variar conforme as condições experimentais, intensidade, tempo de exposição, estado metabólico e fase do ciclo de vida (Regoli *et al.*, 2011a, 2011b; Schulte, 2015; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2017).

O ciclo antioxidante é composto por diversos caminhos, como as quinonas (Q) que reagem com o O_2 para produzir íons superóxido (O_2^-). Tal reação é evitada pela DT-diaforase (DT-D), que reduz as quinonas para hidroquinonas (HQ). A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima dependente de metal (Mn-SOD na mitocôndria e Cu/Zn-SOD no citoplasma) responsável por converter o O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é reduzido a H_2O pela catalase (CAT) ou pela glutathiona peroxidase (GPx), que utiliza a glutathiona total (GSH) como doador de elétrons para catalisar a reação. Na presença de ferro reduzido (Fe^{2+}), H_2O_2 é convertido em radical hidroxílico ($\bullet OH$) através da reação de fenton, que dá início ao processo de peroxidação lipídica, uma reação em cadeia que só termina quando os radicais lipossolúveis são eliminados pela Vitamina E ou pela GPx. A GPx catalisada pela glutathiona-S-transferase (GST) reduzem hidroperóxidos lipídicos em álcool, concomitante com a oxidação da GSH que aqui atua como cofator. A glutathiona oxidada (GSSG) reconverte GSH através da glutathiona redutase (GR) utilizando NADH como redutor através do Ciclo das Pentoses. Quando a oxidação da glutathiona excede sua capacidade de redução pela GR, a GSSG é excretada da célula mantendo os níveis de GSH funcionando ativamente (Regoli *et al.*, 2011a, 2011b; Regoli e Giuliani, 2014).

A GSH é o tripeptídeo não proteico mais abundante no citoplasma e atua como eliminador direto de ROS ou como cofator da GST durante a desintoxicação xenobiótica. A GR é uma flavoenzima que não atua como antioxidante, mas é importante para manter a homeostase GSSG/GSH e o equilíbrio Redox em animais marinhos. A GPx é uma enzima antioxidante atuante na mitocôndria e no citoplasma. A GST é uma enzima de fase II, hidrofílica, que atua como eliminador tanto na via xenobiótica quanto na peroxidação lipídica (Regoli *et al.*, 2011a, 2011b; Regoli e Giuliani, 2014).

CBE é uma enzima alostérica, inibida ou ativada pela fosforilação, isso justifica a atividade da glutatona ser dependente da atividade da CBE (Berg *et al.*, 2010).

A AChE é uma enzima independente da atividade antioxidante da família das colinesterases (ChE), sua atividade está relacionada ao funcionamento do sistema nervoso central e funções neuromusculares. Ela catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, evitando disparos nervosos contínuos, isso permite os neurônios retornem ao estado de repouso após ativação, fundamental para o funcionamento normal do sistema sensorial e neuromuscular. A AChE é considerada um dos bioindicadores ambientais mais antigos, amplamente usado para organismos marinhos e de água doce (Payne *et al.*, 1996). Curiosamente, o estresse oxidativo desempenha um papel importante na regulação da AChE, podendo ativá-la ou inibi-la, causando alterações na sua expressão gênica e má formações no desenvolvimento do sistema nervoso (Schallreuter *et al.*, 2004; Rico *et al.*, 2007; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2015).

Como efeito à peroxidação dos lipídeos e proteínas, a membrana plasmática reduz sua fluidez. Isso restringe as ligações entre lipídeos e proteínas, que provoca falhas musculares e simpáticas, com redução na capacidade cardíaca e limitação no fornecimento de oxigênio, que pode promover falência mitocondrial e colapso metabólico (Schulte, 2015).

1.1.4 Atividade Metabólica

À medida que a temperatura aumenta, as taxas de metabolismo se elevam e diminuem rapidamente, com efeito nas reações químicas e bioquímicas. Pensar em fisiologia térmica é refletir como a temperatura modela a distribuição e abundância das espécies, além de entender bioquimicamente os mecanismos que os embriões possuem para manter os processos fisiológicos mesmo quando influenciados pela temperatura (Clarke, 2003; Clarke e Fraser, 2004).

Segundo as leis da termodinâmica e os princípios físicos da mecânica dos fluidos, a temperatura influencia diretamente as reações bioquímicas. No entanto, pensar que as taxas de reação influenciadas pela termodinâmica teriam alguma relação com as taxas metabólicas nos organismos seria simplificar demais. O metabolismo dos organismos envolve vários processos fisiológicos complexos, e os princípios físicos fornecem uma descrição bem sucedida apenas para sistemas simples, como o princípio da energia de ativação introduzido por Arrhenius (1889-1915), onde a temperatura é a única variável. Portanto, este

conceito é incompatível à fisiologia celular e aos mecanismos de aclimação e adaptação evolucionária, até mesmo porque as taxas de reação evoluíram independentemente da temperatura as quais os organismos estão adaptados para viver. Os processos adaptativos se deram primeiramente no tamanho dos órgãos e tecidos em manutenção do metabolismo energético (Daan *et al.*, 1990), somente depois as taxas metabólicas foram ajustadas aos tecidos, em resposta a sua função, gastos energéticos e temperatura (Clarke, 2003). Assim, o efeito da temperatura sob o metabolismo celular é indireto e pode ser representado pela taxa metabólica dos organismos em estado de repouso, pois descreve o custo energético basal dentro do seu estilo de vida ecológico. (Clarke, 2004; Clarke e Fraser, 2004; Schulte, 2015).

Resumidamente, chamamos de metabolismo a série de reações químicas necessárias para a conversão de moléculas a outras moléculas. Esses processos são dependentes de alguma fonte de energia. Neste caso, o facilitador comum destas reações é o ATP, onde parte do metabolismo é constituído por reações catabólicas que convertem ATP a partir de moléculas energéticas como lipídeos, glicídeos e aminoácidos; e parte utilizam ATP para anabolizar outras moléculas como síntese de nucleotídeos e aminoácidos utilizados nos processos celulares. Partindo desse balanço metabólico, pode-se contabilizar a atividade metabólica dos organismos mensurando o ATP (energia) utilizado nos processos biológicos. Para organismos aeróbios isso é facilitado pelo consumo de oxigênio usado como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória e síntese de ATP, conforme a demanda fisiológica de trabalho (Clarke e Fraser, 2004; Berg *et al.*, 2010).

Uma forma eficiente de avaliar o efeito da temperatura nos processos metabólicos a nível sistêmico, celular e molecular é utilizar o modelo de tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio (OCLTT). Descrito por Pörtner (2010), o modelo OCLTT é representado pela curva de performance aeróbia e capacidade de aclimação (Figura 6). Calculado pela diferença entre metabolismo basal e ativo, o OCLTT descreve a alocação de energia modelada pela temperatura em três faixas térmicas: ótima, *pejus* e péssimo. Quando a temperatura está ótima, o consumo de oxigênio é otimizado e o fornecimento de ATP é elevado, mantendo as atividades fisiológicas com baixo nível de peroxidação e atividade antioxidante, definida como aclimação funcional. Além dos limites ótimos, os custos energéticos aumentam reduzindo o ATP disponível no organismo. O metabolismo anaeróbio aumenta para compensar o déficit energético causado pela falência no metabolismo aeróbio, concomitante às respostas

antioxidantes na eliminação das ROS produzido pela hiperventilação do metabolismo aeróbio. Esta faixa térmica é chamada de *pejus*, refletindo num processo de aclimação de proteção. Posterior ao *pejus*, na faixa péssimo, todo ATP é direcionado para reparar danos celulares causados pelo incremento térmico com aumento nas respostas ao choque térmico, conhecido como aclimação de reparo.

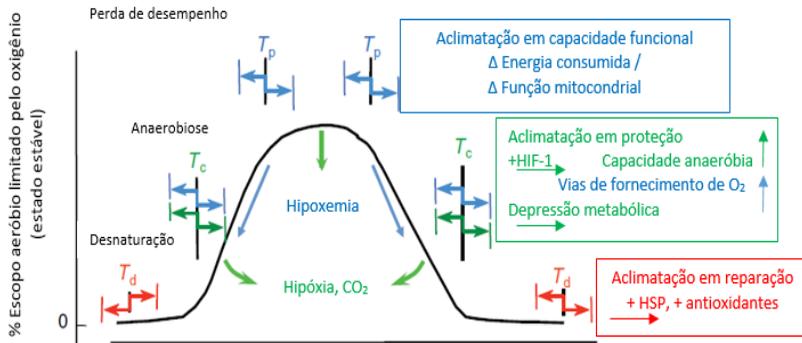


Figura 6. Representação esquemática do modelo de Tolerância Térmica Limitada pela Capacidade de Oxigênio, curva de performance térmica ou alcance aeróbio e capacidade de aclimação (Pörtner, 2010).

Descrever os limites térmicos resulta numa compreensão holística em vários níveis hierárquicos, que compreende desde os processos moleculares até o funcionamento do organismo como um todo. Utilizando a curva de performance térmica e aclimação representada pelo OCLTT, Rodríguez-Fuentes *et al.* (2017) avaliaram o desempenho térmico da lagosta *Panulirus argus* com o uso de indicadores metabólitos (glicose, colesterol, triglicérides, proteína e lactato), pois são nutrientes utilizados como fonte para produção de energia em crustáceos (Rosas *et al.*, 2002). Desta forma, a mobilização de diferentes metabólitos foi utilizada como mecanismo compensatório durante atividade forçada, sugerindo que numa faixa térmica ótima as lagostas fizeram ajustes no metabolismo mobilizando glicose e colesterol, enquanto os níveis de triglicérides foram mobilizados na temperatura *pejus* mínima; e proteína, glicose e lactato foram mobilizados na temperatura “péssimo” máxima.

Considerando que os embriões utilizam as reservas vitelinas para alocação de energia e elevam ao máximo seu metabolismo para se desenvolver (Repolho *et al.*, 2014; Sanchez-García *et al.*, 2017), dependendo o estágio de desenvolvimento, alterações térmicas podem

limitar a capacidade resposta em recuperar possíveis danos causados aos tecidos. Um estudo realizado por Tremblay *et al.* (2017) verificaram quais estágios embrionários os embriões de *O. maya* são mais sensíveis. Os resultados indicam que as maiores taxas metabólicas são no final da organogênese, entre os estágios XV e XVI, quando os corações começam a funcionar. Nos próximos estágios, onde os embriões estão mais desenvolvidos, o metabolismo diminuiu, o que representa maior sensibilidade térmica, sendo o estágio XVII o de maior vulnerabilidade.

Além do conhecimento científico, este trabalho busca resgatar alguns conceitos de sustentabilidade com propósito de fomentar e construir uma aquicultura apoiada em alguns objetivos de desenvolvimento sustentável (SDGs) das Nações Unidas, como: 1) conservação e uso apropriado dos recursos marinhos; 2) conscientização às mudanças climáticas e redução de seus efeitos; 3) proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres; 4) segurança alimentar, melhorar a qualidade nutricional e promover a aquicultura sustentável; 5) igualdade de gênero; 6) educação de qualidade inclusiva; 7) crescimento socioeconômico inclusivo; 8) estabelecer justiça social.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo Geral

O presente estudo busca avaliar a influência das temperaturas 18 °C constante e rampa com início em 18 °C ascendendo 1 °C a cada 5 dias, no desenvolvimento embrionário do polvo *Octopus vulgaris* Tipo II; por meio de avaliações nas mudanças morfológicas dos embriões, bioindicadores do sistema de defesa antioxidante e indicadores metabólicos, em ambiente com temperatura controlada.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o estresse oxidativo e os mecanismos de proteção celular por meio de análises enzimáticas antioxidantes e lipídicas, e níveis de concentração de ROS.

- Avaliar a plasticidade metabólica por meio de análise dos metabólitos mobilizados como substratos para produção de ATP em cefalópodes.

- Avaliar o efeito das temperaturas 18 °C constante e rampa com início em 18 °C ascendendo 1 °C a cada 5 dias, nas características morfológicas dos embriões, incluindo a taxa de crescimento das

diferentes variáveis morfométricas: braços, manto, olhos e volume do vitelo.

1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

O trabalho foi redigido sob a estrutura de artigo científico conforme os padrões da revista **Aquaculture**, sendo apresentado em cinco seções: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Referências.

2 CAPÍTULO ÚNICO

Formato estrutural segundo os padrões da revista **Aquaculture**.

Efeito da Temperatura no Desenvolvimento Embrionário do Polvo *Octopus vulgaris* Tipo II

Luciana Guzella^{a,*}, Carlos Rosas^d, Penélope Bastos Teixeira^b, Karen Ortega^d, Ariadna Sánchez^d, Gabriela Rodríguez-Fuentes^e, Felipe do Nascimento Vieira^c, Claudio Manoel Rodrigues de Melo^a

^a Laboratório de Moluscos Marinhos. Departamento de Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^b Laboratório de Nutrição de Organismos Aquícolas. Departamento de Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^c Laboratório de Camarões Marinhos. Departamento de Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^d Unidade Multidisciplinar de Docência e Investigação. Faculdade de Ciências. Universidade Nacional Autónoma de México. Sisal, Yucatán, México.

^e Unidade de Química. Faculdade de Química. Universidade Nacional Autónoma do México. Sisal, Yucatán, México.

* Autor Correspondente: Laboratório de Moluscos Marinhos. Departamento de Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Rua Beco dos Coroas, s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. E-mail: lu_lg@hotmail.com (Luciana Guzella).

RESUMO

Temperaturas além dos limites térmicos provocam o estresse oxidativo, com a formação de espécies reativas de oxigênio, causando danos aos tecidos. Com base no modelo de tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio, e utilizando padrões fisiológicos como: I) bioindicadores do sistema de defesa antioxidante e enzimas lipídicas; II) indicadores metabólicos; III) taxas de crescimento morfométrico; este estudo teve por objetivo avaliar a influência da temperatura no desenvolvimento embrionário do polvo *Octopus vulgaris* Tipo II. Para isso, os embriões foram submetidos a dois tratamentos de temperatura: T1) 18 °C constante; T2) temperatura rampa, variando de 18 a 24 °C com incremento de 1 °C a cada 5 dias. De acordo com o comportamento termorregulador e a plasticidade metabólica apresentada pelos embriões,

sugerimos que 18 °C seja o intervalo térmico em que os embriões experimentaram uma temperatura *pejus* (*pejus* em latim significa “piorando”, “prejuízo”). Os embriões expostos à temperatura 18 °C constante não conseguiram compensar o estresse térmico, que desencadeou num processo de resistência, com o funcionamento do sistema de defesa antioxidante até atingir condições térmicas críticas, quando o metabolismo aeróbio foi deprimido. Como consequência, os embriões mantidos neste tratamento apresentaram crescimento lento, irregular e subdesenvolvimento, com baixa taxa de eclosão e paralarvas morfometricamente deformes. No tratamento rampa até a temperatura de 22 °C, o crescimento dos embriões foi favorecido e o estresse térmico compensado, apresentando redução dos níveis de proteínas oxidadas. A partir da temperatura de 23 °C, o fornecimento de ATP foi reduzido e as defesas antioxidante aumentada, atingindo máxima atividade de proteção celular, sugerindo desta forma que 23 °C seja uma temperatura *pejus*. Na temperatura de 24 °C, o metabolismo dos embriões aumentou 94%, demonstrando falência do metabolismo aeróbio e inibição do sistema de defesa antioxidante, atingindo condições térmicas críticas na “faixa péssimo”. Neste trabalho, os embriões de ambos os tratamentos alcançaram condições térmicas críticas, seja pelo tempo de exposição à temperatura *pejus* ou através do aumento gradual da temperatura até atingir a temperatura crítica, respectivamente, 18 e 24 °C. Isso sugere o possível intervalo térmico de desempenho que os embriões de *O. vulgaris* Tipo II estão adaptados (18-23 °C).

Palavras-chave: Tolerância Térmica. Sistema de Defesa Antioxidante. Metabolismo.

ABSTRACT

Temperatures beyond the thermal limits provoke oxidative stress with the formation of reactive oxygen species, causing damage to the tissues. Based on the model oxygen- and capacity-limitations of thermal tolerance, and using physiological patterns such as: I) bioindicators of the antioxidant defense system and lipid enzymes; II) metabolic indicators; III) morphometric growth rates, this study aimed to evaluate the effect of temperature on the embryonic development of *Octopus vulgaris* Type II. For this, embryos were exposed to two temperature treatments: T1) constant temperature 18 °C; T2) ramp temperature, ranging from 18 to 24 °C with increment of 1 °C every 5 days. According to the thermoregulatory behavior and the metabolic plasticity

presented by the embryos, the results suggest that 18 °C is the thermal interval where embryos experienced *pejus* temperature (*pejus* in Latin means "worsening", "injury"). Embryos exposed at constant temperature 18 °C failed to compensate the thermal stress, which triggered a process of resistance with the functioning of the antioxidant defense system until the critical thermal limit was reached, when the aerobic metabolism was depressed. As consequence, the embryos maintained in this treatment presented slow and irregular growth and underdevelopment, with low hatch rate and morphological deformed paralarvae. At the ramp temperature up to 22 °C, the growth of the embryos was favored and the thermal stress compensated, leading to a low level of oxidized proteins. From the temperature of 23 °C, the ATP supply was reduced and the antioxidant defenses increased, achieving maximum cellular protection activity, thus suggesting that 23 °C is a *pejus* temperature. At 24 °C, the embryos metabolism increased by 94%, demonstrating failure of aerobic metabolism and inhibition of the antioxidant defense system, reaching critical thermal conditions in the "worst range". In this study, the embryos of both treatments reached the critical thermal conditions, either by time of exposure to *pejus* temperature or through the gradual increase of the temperature up to the critical temperature, respectively, 18 and 24 °C. This suggests the possible thermal performance range that *O. vulgaris* Type II embryos are adapted to (18-23 °C).

Keywords: Thermal Tolerance. Antioxidant Defense System. Metabolism.

2.1 INTRODUÇÃO

Estudos avaliaram a influência da temperatura no desenvolvimento embrionário dos polvos *Octopus mimus* (Uriarte *et al.*, 2012), *Enteroctopus megalocyathus* (Uriarte *et al.*, 2016), *Octopus maya* (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016) e *Octopus vulgaris sensu stricto* (Repolho *et al.*, 2014), e descreveram que o melhor desempenho zootécnico destas espécies foram obtidos, respectivamente, nas temperaturas: 18 °C, 15-16 °C, 22-26 °C e 18 °C. Para cada espécie de polvo existe uma faixa ideal de temperatura, as quais não afetem o desenvolvimento dos embriões, visto que, os estágios ontogênicos iniciais são os mais sensíveis do ciclo de vida (Repolho *et al.*, 2014), e determinam o recrutamento de juvenis e a dinâmica das populações em ambiente natural (Chédia *et al.*, 2010; Vidal, 2014).

Os processos embrionários são extremamente dependentes da temperatura, podendo acelerar ou retardar o tempo de desenvolvimento dos embriões, determinando as condições de sobrevivência e crescimento das paralarvas (Boletzky e Hanlon, 1983; Boletzky, 1989, 1994; Boyle e Rodhouse, 2005). Esta relação foi corroborada por Mangold e Boletzky (1973) quando ovos de *O. vulgaris* foram submetidos às temperaturas constantes de 13, 15, 20 e 25 °C, demonstrando que o tempo de desenvolvimento dos embriões variou de 23 a 125 dias, o que corresponde ao intervalo térmico durante o período de desova da espécie na costa do Mar Mediterrâneo Sul na França (Banyuls-sur-Mer).

Incrementos de temperatura além do intervalo ótimo térmico reduziram as taxas de crescimento e sobrevivência de embriões e paralarvas da lula *Loligo vulgaris* (Rosa *et al.*, 2012) e do polvo *O. vulgaris sensu stricto* (Repolho *et al.*, 2014), provocando eclosões prematuras em ambas as espécies. Os autores ainda relatam que o aumento da atividade metabólica, influenciada pelo incremento de temperatura, provocou a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica como malondialdeído (MDA) e ativação dos mecanismos de defesa antioxidante nos estágios avançados da embriogênese e nas paralarvas recém eclodidas. Sanchez-García *et al.* (2017) descobriram que o limite térmico dos embriões de *O. maya* é 27 °C, mesma temperatura limite para maturação e desova das fêmeas (Juárez *et al.*, 2015). Acima desta temperatura, a taxa metabólica e a frequência respiratória dos embriões aumentou, respectivamente 13% e 63% em comparação ao grupo mantido a 24 °C.

As progressivas ROS provocadas por variações de temperaturas além dos limites térmicos levam ao estresse oxidativo (Pörtner, 2001; Vinagre *et al.*, 2016), refletindo em mudanças nas funções enzimáticas que se diferem em termos de reatividade e danos aos lipídeos, proteínas e DNA, trazendo efeito intracelular, metabólico e biotransformador (Regoli *et al.*, 2011b). Para neutralizar este efeito, as células aeróbias desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante, caracterizado por vários eliminadores de baixo peso molecular e defesa enzimática, que integram uma cascata de reações com efeitos diretos e indiretos na neutralização das ROS ou oxidando-as a outro radical. (Regoli *et al.*, 2011a, 2011b; Regoli e Giuliani, 2014; Schulte, 2015; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2017).

Para compreender os processos metabólicos modulados pela temperatura, faz-se necessário conhecer os mecanismos fisiológicos que os embriões possuem para manter os processos bioquímicos e

metabólicos quando influenciados pela temperatura (Clarke, 2003, 2004; Clarke e Fraser, 2004). Segundo Schulte (2015), a forma mais simples de representar isso é por meio de uma curva de performance térmica (TPC), sendo melhor demonstrada pelo modelo de tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio (OCLTT). Descrito por Pörtner (2010), o OCLTT descreve três faixas térmicas conforme a alocação de energia modelada pela temperatura, onde caracteriza o alcance aeróbio como: ótimo, *pejus* e péssimo. Quando a temperatura é ótima o fornecimento de energia (ATP) é otimizado, mantendo todas as atividades fisiológicas com baixo nível de peroxidação. Na temperatura *pejus*, iniciam-se os processos de hipoxemia, hiperventilação e formação de ROS, com a ativação de mecanismos de proteção celular antioxidante. Na faixa péssimo, quando as temperaturas críticas são atingidas, ocorre depressão do metabolismo aeróbio e as defesas celulares de proteção ao choque térmico são ativadas, sendo todo o ATP disponível direcionado à reparar danos celulares.

Recentemente, nome da espécie *Octopus vulgaris* foi reclassificado por marcadores genéticos e morfológicos em cinco espécies distintas que integram o complexo *Octopus vulgaris* de espécies, sendo elas: *Octopus vulgaris sensu stricto*, Tipo I, II, III e IV (Cabranes *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2010; FAO, 2016; Amor *et al.*, 2017). Segundo Amor *et al.* (2017) o polvo *Octopus vulgaris* Tipo II é uma espécie distinta dentro do complexo *O. vulgaris* de espécies, com distribuição no Oceano Atlântico Sul ao longo da costa subtropical do Brasil. Dentro da faixa de distribuição do *O. vulgaris* Tipo II, Moreira *et al.* (2011) identificaram por meio de análises genéticas com microssatélites quatro populações distintas ao longo da costa sul brasileira. Segundo Haimovici e Andriguetto-Filho (1986), a distribuição do *O. vulgaris* Tipo II se estende até extremo sul do Brasil, onde foram encontrados machos e fêmeas sexualmente maduros nos meses de primavera e verão.

Mesmo sabendo da relevância econômica do polvo como recurso pesqueiro no mercado nacional (Ávida-da-Silva *et al.*, 2014) e mundial (Iglesias *et al.*, 2014), com a segunda maior captura notificada pela FAO (2016) na América Latina no ano de 2010 com 2.000 t, a maioria dos estudos ainda são embasados na espécie *O. vulgaris sensu stricto*. Desta forma, não há informações que relacionem os efeitos da temperatura na performance reprodutiva, estágios ontogênicos iniciais do ciclo de vida e comportamento do polvo *O. vulgaris* Tipo II. Essas informações são importantes para entender como a temperatura modula a biogeografia e o ciclo de vida do *O. vulgaris* Tipo II em ambiente natural, permitindo a

criação de novas diretrizes que possam melhor gerenciar este recurso pesqueiro. Além de fornecer conhecimento que promova o desenvolvimento de tecnologias que viabilizem a aquicultura sustentável de juvenis da espécie em escala comercial, visto que, um dos obstáculos para a aquicultura do complexo *O. vulgaris* de espécies está relacionado à produção viável de paralarvas diretamente conectada aos estágios de maturação e desenvolvimento embrionário adequado (Uriarte *et al.*, 2012, 2016; Repolho *et al.*, 2014; Iglesias *et al.*, 2014; Vidal, 2014; Juárez *et al.*, 2015, 2016; Caamal-Monsreal *et al.*, 2016).

Assim, com base no modelo OCLTT (Pörtner, 2001, 2010), e utilizando padrões fisiológicos como: 1) indicadores metabólicos mobilizados para o fornecimento de energia nos cefalópodes (Rosa *et al.*, 2004, 2005; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2017); 2) bioindicadores do sistema de defesa antioxidante e enzimas lipídicas; 3) taxas de crescimento morfométrico e estimativa do volume de vitelo; o presente estudo busca avaliar a influência da temperatura no desenvolvimento embrionário do polvo *Octopus vulgaris* Tipo II. Para isso, propomos que os embriões sejam expostos a incrementos graduais de temperatura, onde possam expressar seu comportamento termorregulador e sua plasticidade metabólica na regulação de ROS.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de Adultos de *Octopus vulgaris* Tipo II

Este estudo foi realizado na Estação de Maricultura Professor Elpídio Beltrame da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis/Brasil. Espécimes selvagens de *Octopus vulgaris* Tipo II foram capturadas próximo à Ilha do Coral (27°52'11.57"S; 48°32'38.39"O), com uso de armadilhas do tipo pote amarrado a espinheis entre 5-10 m de profundidade, durante o mês de abril/2017. Após a captura, os polvos foram transportados, em caixa de transporte de 500 L, ao laboratório seguindo os procedimentos descritos por Vidal (2014).

Em laboratório, os polvos foram separados por sexo e peso (500-999 g, 1000-1499 g e >1500 g) e aclimatados por sete dias em tanques com volume útil de 5 m³, aeração constante, fluxo aberto com taxa de renovação de 200%.dia⁻¹, salinidade 34 (±0,46) PSU, oxigênio dissolvido (OD) de 6,94 (±0,60) mg.L⁻¹, temperatura de 21 °C (±0,88 °C) e fotoperíodo de 10 h. O alimento foi ofertado na proporção de 50% siri (*Callinectes danae*) e 50% mexilhão (*Perna perna*), a 10% da

biomassa duas vezes ao dia. Após aclimação, os polvos foram separados em tanques sob as mesmas condições com razão sexual 1:3 (macho/fêmea) para cópula. Após cópula, o macho foi retirado do tanque e as fêmeas monitoradas até o início da desova. Durante o período de maturação, a oferta de alimento foi aumentada até a saciedade aparente das fêmeas ser alcançada. Pouco antes da desova, cada fêmea foi transferida para tanques individuais com volume útil de 200 L sob mesmas condições de aclimação. Para a realização deste experimento foram utilizadas massas de ovos de duas fêmeas.

2.2.2 Delineamento Experimental

Após postura, 90 pencas de ovos por fêmea entre os estágios IV-VI descritos por Naef (1928) foram distribuídas aleatoriamente em dois sistemas idênticos de incubadoras. Cada sistema foi composto por três unidades experimentais com volume útil de 70 L cada, abastecido com água marinha filtrada a 0,5 μm e esterilizada com ultravioleta (UV) 35 W em recirculação e temperatura controlada. Cada sistema (Figura 7) foi equipado com um reservatório de 140 L, motobomba de recalque, filtro físico de 200 μm , filtro biológico, esterilização UV 5 W, aquecedor de titânio, controlador de temperatura ($\pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$), aeração constante, fotoperíodo de 10 h em sala climatizada mantida à temperatura de 18 $^{\circ}\text{C}$.

As pencas de ovos foram suspensas por cordas de nylon e mantidas em fluxo constante com taxa de recirculação de 1.000%.dia⁻¹. A aclimação dos ovos foi lenta e gradual (2-3 $^{\circ}\text{C}.\text{dia}^{-1}$) até a temperatura de cada tratamento ser atingida, dando início ao experimento. Dois tratamentos de temperatura foram testados: T1) temperatura de 18 $^{\circ}\text{C}$ constante (Moxica *et al.*, 1999; Repolho *et al.*, 2014); T2) temperatura rampa, com início em 18 $^{\circ}\text{C}$ ascendendo 1 $^{\circ}\text{C}$ a cada 5 dias (0,2 $^{\circ}\text{C}.\text{dia}^{-1}$). O experimento foi finalizado quando os embriões de todas as incubadoras atingiram o estágio XX de desenvolvimento.

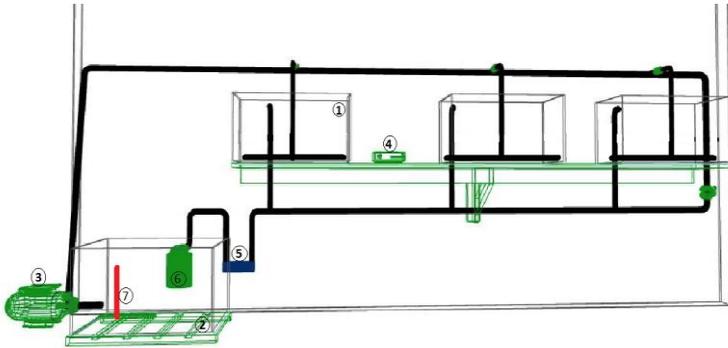


Figura 7 Desenho esquemático das unidades experimentais mantidas em recirculação para incubação dos ovos do polvo *Octopus vulgaris* Tipo II. 1) Unidades experimentais. 2) Reservatório. 3) Motobomba de recalque. 4) Controlador de temperatura 5) Reator UV. 6) Filtro físico e biológico. 7) Aquecedor de titânio.

A cada 5 dias, uma penca de ovos de cada unidade experimental em cada tratamento foi coletada para as seguintes análises: morfometria dos embriões, atividade antioxidante e avaliação de metabolismo. A morfometria dos embriões foi a única análise realizada no momento em que a amostra foi coletada. As demais foram identificadas e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e liofilizadas para posterior análise.

2.2.3 Sobrevivência na Eclosão

A taxa de eclosão foi obtida pela razão do número de ovos eclodidos pelo número de ovos total. O número de ovos total foi estimado a partir da proporção do número de ovos por unidade de comprimento de penca ($n=23$ pencas de ovos). A sobrevivência das paralarvas se deu por contagem diária do número de paralarvas sem movimento natatório em cada unidade experimental.

2.2.4 Sistema de Defesa Antioxidante e Atividade das Enzimas Lipídicas Acetilcolinesterase (AChE) e Carboxilase (CBE)

As análises enzimáticas foram realizadas na Unidade de Química da Universidade Nacional Autônoma do México em Sisal/Yucatán. As amostras de embriões de polvo liofilizado foram homogenizadas a frio na proporção de 50 mg de tecido por 2.000 μL de buffer tris pH 7,4 com

o uso de um homogenizador Potter-Elvehjem. Na sequência, o homogeneizado foi dividido em tubos para realização das seguintes análises: glutationa total (GSH), peroxidação lipídica (LPO), carboxilação de proteínas (PO), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), carboxilase (CBE) e acetilcolinesterase (AChE). Para as análises de AChE, CAT, SOD, CBE e GST, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RCF por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante separado. Os tubos com o preparado de amostras foram armazenados em freezer -80 °C até o momento da análise.

A atividade da AChE foi realizada utilizando o método de Ellman *et al.* (1961), adaptado por Rodríguez-Fuentes *et al.* (2008) para leitor de microplacas. A reação se dá pela adição de ácido 5,5'-ditiobis (2 nitrobenzenóico) (DTNB) 0,5 mM em buffer tris pH 7,4 0,05 M e acetilcolina iodeto 20 mM. Leitura da absorbância a 405 nm durante 135 s.

A atividade da SOD foi determinada usando Kit Sigma-Aldrich (19160), o qual converte SOD usando 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazólio monossódico, produzindo uma corrente formazana resultante da redução do sal tetrazólio com ânion superóxido. Em leitura com absorbância de 450 nm durante 1.200 s, é possível quantificar o ânion superóxido, a atividade da SOD e sua inibição pela diferença colorimétrica.

A concentração da GSH foi mensurada com o uso de Kit Sigma-Aldrich para ensaio de glutationa (CA0260), onde a GSH é reconvertida pela glutationa redutase (GR). O grupo sulfidril da GSH reage com reagente de Ellman, produzindo um composto amarelo. Leitura da absorbância a 405 nm por 615 s. A concentração de LPO foi avaliada usando Kit Sigma-Aldrich para detectar peróxidos PD1, onde os peróxidos são oxidados por ferro (Fe^{3+}) em pH ácido, formando um composto colorido com laranja de xilenol, lido em absorbância a 595 nm.

A atividade da CAT foi quantificada pelo método UV com buffer de fosfato pH 7,4 50 mM e molibdato de amônia com e sem peróxido de hidrogênio 30% em microplacas distintas. Leitura de ambas microplacas em absorbância a 405 nm. A atividade da GST foi medida com Kit Sigma-Aldrich CS04, usando glutationa redutase 200 mM, buffer de fosfato salino pH 7,4 e solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 100mM (CDNB). Leitura da absorbância a 340 nm por 300 s.

A atividade da CBE foi determinada pelo método descrito por Mastropaolo e Yourno (1981), usando 4-nitrofenil acetado (PNPA) em buffer tris pH 7,4 e metanol. Leitura da absorbância a 405 nm por 300 s.

A concentração de PO foi avaliada pelo método descrito Mesquita *et al.* (2014) com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM em ácido clorídrico 2 N e hidróxido de sódio 6 M. Leitura da absorbância a 450 nm.

2.2.5 Metabólitos dos Embriões

As análises metabólicas foram realizadas na Unidade Multidisciplinar de Docência e Investigação da Universidade Nacional Autónoma do México em Sisal/Yucatán. Primeiramente, a parte úmida das amostras de embriões de polvo liofilizadas foram reconstituídas com água livre de perogênio na proporção de 80% do peso corporal. Na sequência, as amostras foram homogenizadas a frio, na razão de 30 mg de tecido liofilizado por 100 μ L de água livre de perogênio usando homogenizador Bertin Minilys. As amostras foram centrifugadas a 20.000 RCF por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante separado para seguintes análises: glicose, colesterol, triglicerídeos, proteína e lactato.

Os metabólitos foram quantificados com o uso de kits comerciais conforme instruções do fabricante: glicose (ELITech GPSL-5505), colesterol (ELITech CHSL-5505), triglicerídeos (ELITech TGML-5415) e lactato (Trinity 735-10). Cada método foi adaptado para leitura em microplacas usando 10 μ L de extrato de tecido e 200 μ L de solução enzimática reativa. Para avaliação de proteína foi utilizado o método descrito por Bradford (1976), adaptado para microplacas usando reagente Bradford e leitura da absorbância a 595 nm. Os cálculos das concentrações dos metabólitos foram obtido pela curva de soluções padrão expresso em mg.mL^{-1} .

2.2.6 Análise Morfométrica e Quantificação do Vitelo

Aproximadamente 15 ovos por amostra foram identificados e caracterizados morfometricamente com o uso de imagens obtidas por uma câmera fotográfica ZEISS Axiocam ERc 5s acoplada em microscópio invertido ZEISS Promovert, com objetiva 4x e software de imagem ZEISS ZEN 2011.

No total 350 embriões foram identificados e mensurados. Os estágios de desenvolvimento foram definidos segundo Naef (1928). A caracterização morfométrica dos embriões (Figura 8) e avaliação de crescimento se deu por meio de medições ventral no comprimento do ovo (EL), comprimento total do embrião (ETL), comprimento do manto

(ML), comprimento do braço (AL) e diâmetro do olho (ED), realizadas pelo programa de domínio público ImageJ versão 1.51j8.

A quantificação de vitelo foi determinada pela soma do volume do vitelo interno e externo, onde foram calculados para cada embrião por meio das seguintes fórmulas, de acordo com metodologia desenvolvida por Vidal *et al.* (2002):

$$\text{Cilindro: } \mathcal{V} = \frac{\pi D^2 \mathcal{H}}{4} \quad (1)$$

$$\text{Elipsóide Rotacional: } \mathcal{V} = \frac{\pi \mathcal{A} \mathcal{B}^2}{3} \quad (2)$$

$$\text{Esfera: } \mathcal{V} = \frac{\pi D^3}{6} \quad (3)$$

Onde \mathcal{V} é o volume de vitelo (mm^3); \mathcal{A} e \mathcal{B} são respectivamente, a metade do comprimento e a metade da largura do saco vitelino; \mathcal{D} e \mathcal{H} são respectivamente, a largura e o comprimento do saco vitelino. O volume total de vitelo foi convertido para peso úmido pela da multiplicação do valor de densidade $1,036 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-3}$ (Vidal *et al.*, 2002).

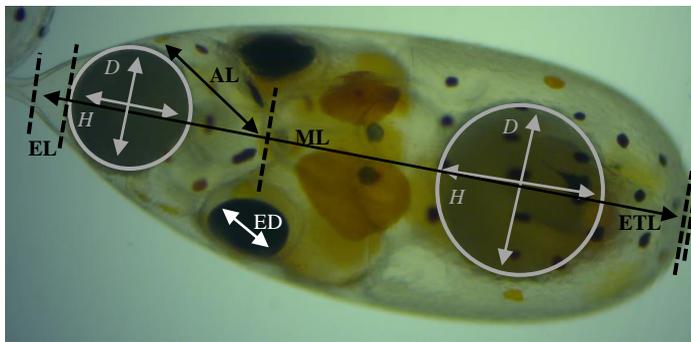


Figura 8 Representação das medidas efetuadas nos embriões de polvo *Octopus vulgaris* Tipo II, onde EL é o comprimento do ovo, ETL é o comprimento total do embrião, ED é o diâmetro do olho, AL é o comprimento do braço, ML é o comprimento do manto. Saco vitelino interno e externo, H é o comprimento do saco vitelino e D é a largura do saco vitelino.

2.2.7 Análise Estatística

2.2.7.1 Análise de desenvolvimento embrionário

A relação entre os estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928) com a idade dos embriões foi analisada por análise de regressão

linear, usando modelo logaritmo (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016; Sanchez-García *et al.*, 2017):

$$\text{Estágio NAEF} = a + b * \ln[\text{idade}(d)] \quad (4)$$

Onde a e b são parâmetros do modelo.

Realizou-se uma ANOVA, seguindo os pré-requisitos de normalidade e homocedasticidade, para verificar se houve diferença estatística na relação de idade dos embriões e estágios de desenvolvimento entre os tratamentos, ao nível de 5% de probabilidade.

2.2.7.2 Sistema de defesa antioxidante, enzimas lipídicas e metabólitos

Os resultados das enzimas SOD, CAT, CBE, GST e GSH e dos metabólicos foram analisados usando o método das respostas biomarcadoras integradas (IBR), permitindo que as respostas dos biomarcadores sejam expressas na forma de “índice de estresse” (Beliaeff e Burgeot, 2002). Assim, tanto o efeito térmico na atividade enzimática quanto no metabolismo podem ser avaliados ao longo do desenvolvimento embrionário. Para o cálculo, os dados foram padronizados conforme a equação: $Y = \frac{(X-m)}{S}$; onde, Y é o dado padronizado, X é a resposta do biomarcador, m é a média das respostas do biomarcador e S é o desvio padrão do biomarcador. Caso o biomarcador tenha efeito biológico de atividade o valor de Z é calculado $Z = Y$, caso tenha inatividade $Z = -Y$. O valor mínimo (Min) é obtido e S é calculado: $S = -Z + |Min|$, onde $S \geq 0$ e $|Min|$ é valor absoluto. A área do gráfico de estrela (A_i) foi calculada pela fórmula: $A_i = \frac{S_i}{2} \sin \beta (S_i \cos \beta + S_{i+1} \sin \beta)$, onde $\beta = \text{Arc tan}(\frac{S_{i+1} \sin \alpha}{S_i - S_{i+1} \cos \alpha})$, α é $\frac{2\pi}{n}$ radianos, S_i é o valor obtido para cada biomarcador. A soma da A_i corresponde ao valor de IBR: $\sum_{i=1}^n A_i$, onde n é o número de biomarcadores.

As concentrações de ROS (LPO e PO) e AChE foram analisadas segundo o teste não paramétrico de Mann-Whitney, verificando se houve diferenças entre os tratamentos ao longo do desenvolvimento dos embriões. Esta análise foi feita no software Statistica 7, com grau de significância de 5%.

2.2.7.3 Caracterização morfométrica e quantificação do vitelo

Para verificar alterações no comprimento do ovo (EL), comprimento total do embrião (ETL), comprimento do manto (ML), comprimento do braço (AL), diâmetro do olho (ED) e volume do vitelo (YV) ao longo do desenvolvimento dos embriões em cada tratamento, foram utilizados modelos de regressão lineares e não lineares. Foi realizada uma análise de variância ANOVA de um fator para avaliar se estas características foram influenciadas pelos tratamentos de temperatura, previamente verificando os pré-requisitos de normalidade e homocedasticidade com os testes de Shapiro-Wilk e Levene.

Foi aplicada uma análise de componentes principais (PCA) às variáveis morfométricas ao longo do desenvolvimento embrionário entre os tratamentos de temperatura utilizando matriz Euclidiana de correlação (Legendre e Legendre, 1998), a fim de explicar quais características morfológicas foram mais afetadas pela temperatura.

Para avaliar as mudanças morfológicas dos embriões após a organogênese entre os tratamentos, foi realizada variância ANOVA fatorial a partir do estágio XV usando como variáveis independentes tratamentos e estágios de desenvolvimento. Após foi realizado teste de médias de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Statistica 7, com grau de significância de 5%.

2.3 RESULTADOS

Não houve diferença significativa entre os tratamentos 18 °C e rampa na relação estágios de desenvolvimento e a idade dos embriões ($F=0,51$; $P=0,47$) (Figura 9). Os embriões incubados à temperatura 18 °C constante levaram 68 dias para atingir o estágio XX de desenvolvimento e apresentaram taxa de eclosão de 30,86%, enquanto os embriões mantidos na temperatura rampa (18-24 °C) alcançaram o estágio XIX após 48 dias com taxa de eclosão de 45,40%. Menos de 1% dos embriões mensurados no tratamento rampa completaram o estágio XX. As paralarvas nos dois tratamentos apresentaram má formações no manto, olhos e braços, sendo visualizado na temperatura rampa maior quantidade de paralarvas prematuras com a presença de reservas de vitelo externo entre os braços. A taxa de mortalidade das paralarvas foi de 100% até 1 dia após a eclosão.

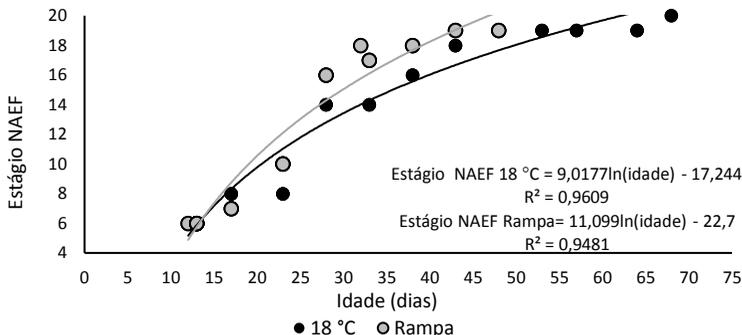


Figura 9 Efeito da temperatura no desenvolvimento embrionário do polvo *Octopus vulgaris* Tipo II. Embriões mantidos à temperatura 18 °C constante (círculos e linha preta) e temperatura rampa, variando de 18 a 24 °C com incremento de 1 °C a cada 5 dias (círculos e linha cinza). Estágios de desenvolvimento foram identificados segundo Naef (1928). n=350 embriões. Os parâmetros (intercepto e coeficiente angular) da equação de regressão são diferentes de zero ($P < 0,05$).

O sistema antioxidante demonstrado no gráfico de estrela no tratamento 18 °C constante (Figura 10A) indica maior atividade da glutatona (GSH e GST) e da CBE no estágio XVI. No estágio XX a enzima com maior atividade foi a SOD, com inibição completa da GSH. A CAT foi a última enzima a ser ativada no estágio XVIII. No tratamento rampa, o gráfico de estrela (Figura 10B) mostra maior atividade da GSH, GST e CBE entre os estágios XVI-XVIII, com inibição no estágio XIX. A CAT também foi a última enzima a ser ativada, apresentando maior atividade concomitante a atividade da SOD no estágio XVI, seguida de inibição da CAT no estágio XVII. Foi visualizado no estágio VI, em ambos tratamentos, baixa atividade da glutatona e CBE, seguida de inibição. As respostas biomarcadoras integradas (IBR) do sistema antioxidante (Figura 10C) demonstra, a partir do estágio X, incremento de atividade enzimática nos dois tratamentos, com maior atividade nos estágios XVI e XVII, seguida de inibição no estágio XX no tratamento 18 °C e no estágio XIX na temperatura rampa.

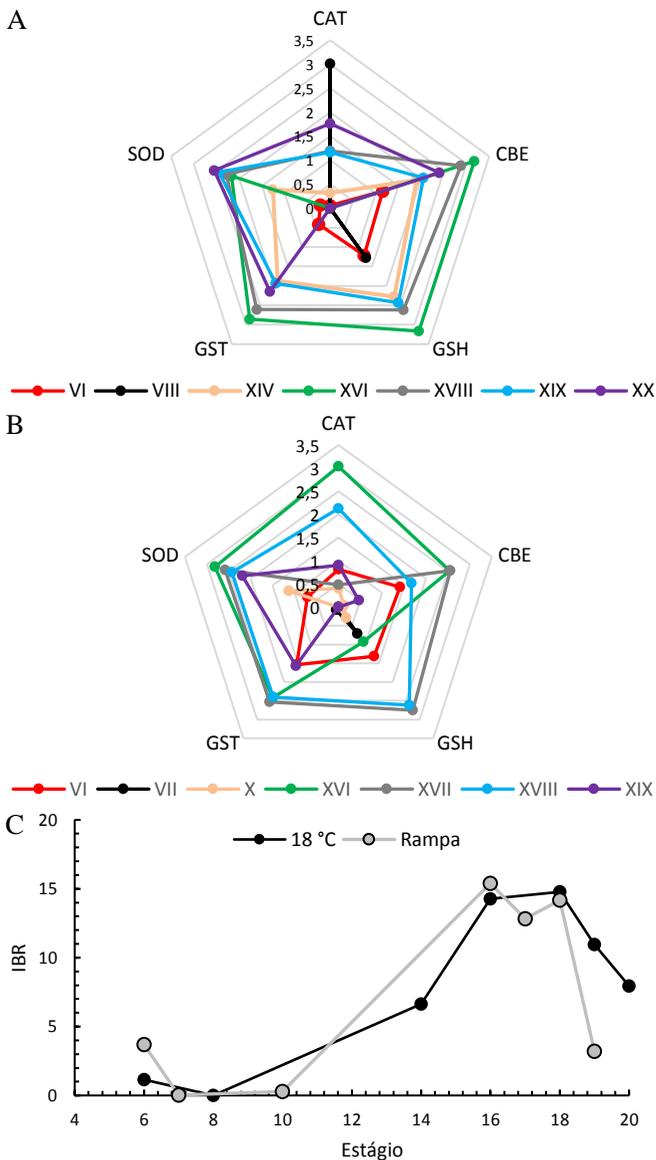


Figura 10 Gráfico de estrela dos mecanismos antioxidante por estágio de desenvolvimento dos embriões de *Octopus vulgaris* Tipo II expostos aos tratamentos de temperatura 18 °C constante (A) e temperatura rampa (18-24 °C) (B). Valores calculados para as respostas biomarcadoras integradas (IBR) (C) expressas em índice de atividade antioxidante ao longo da embriogênese entre

os tratamentos 18 °C constante (círculos preto) e temperatura rampa (círculos cinza). Estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928).

As maiores concentrações de PO (Figura 11A; $Z=-0,46$; $P=0,64$) e AChE (Figura 11C; $Z=0,75$; $P=0,45$) foram no tratamento 18 °C, com aumento a partir do estágio XVIII. As concentrações de LPO (Figura 11B; $Z=1,07$; $P=0,28$) foram maiores no estágio VIII no tratamento 18 °C constante.

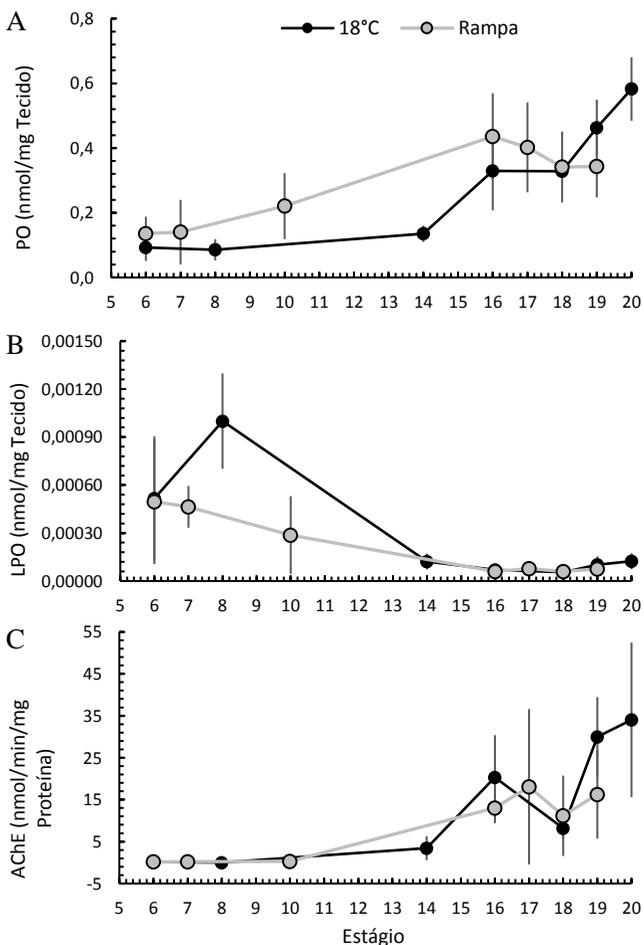
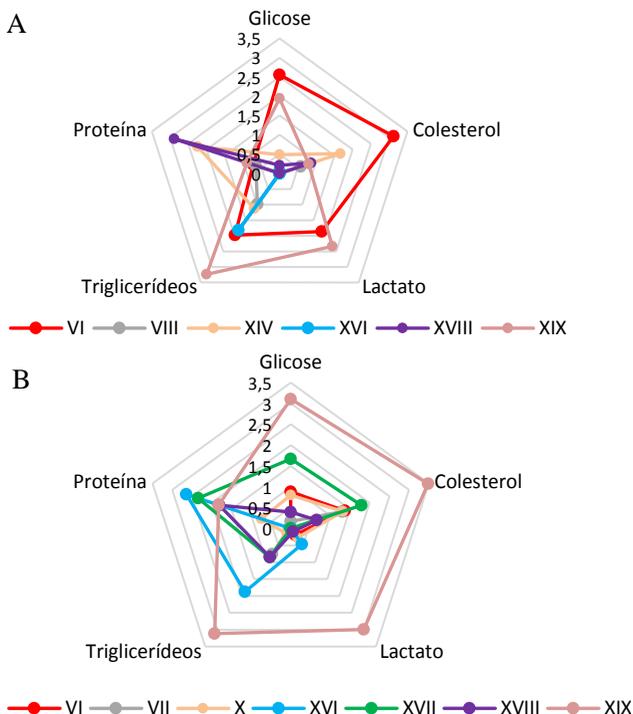


Figura 11 Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Concentrações de proteínas oxidadas (PO) (A), lipídeos peroxidados (LPO) (B) e atividade da acetilcolinesterase (AChE) (C) entre os tratamentos de temperatura 18 °C

constante (círculos preto) e temperatura rampa (18-24 °C) (círculos cinza) ao longo do desenvolvimento embrionário do *Octopus vulgaris* Tipo II. Valores de média e desvio padrão. Estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928).

Em geral, os gráficos de estrela dos metabólitos (Figura 12A, B) indicam que a energia mobilizada para os embriões durante a embriogênese foi principalmente proteica e lipídica para ambos os tratamentos. As exceções foram nos estágios XIX no tratamento 18 °C constante, onde as concentrações dos metabólitos foram aumentadas, com mobilização de glicose e lactato (Figura 12A). No tratamento rampa, o estágio XIX apresentou concentração elevada de glicose, colesterol, triglicerídeos e lactato (Figura 12B). O IBR de metabolismo (Figura 12C) indicou redução da atividade metabólica no estágio XVI no tratamento 18 °C, enquanto no tratamento rampa a redução foi visualizada no estágio XVIII. Os maiores picos de atividade metabólica foram visualizados nos estágios VI e XIX no tratamento 18 °C, e no estágio XIX na temperatura rampa.



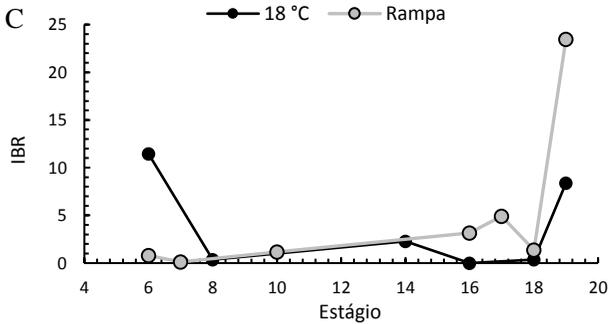


Figura 12 Gráfico de estrela dos indicadores metabólitos por estágio de desenvolvimento dos embriões de *Octopus vulgaris* Tipo II expostos aos tratamentos de temperatura 18 °C constante (A) e temperatura rampa (18-24 °C) (B). Valores calculados para as respostas de biomarcadoras integradas (IBR) (C) expressas em índice de metabolismo no desenvolvimento embrionário entre os tratamentos 18 °C constante (círculos preto) e temperatura rampa (círculos cinza). Estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928).

Nenhuma das variáveis morfométricas apresentou diferença significativa ao longo do desenvolvimento embrionário entre os tratamentos de temperatura (Tabela 1; $P > 0,05$).

A análise de componentes principais (PCA) mostrou que os embriões incubados na temperatura rampa formaram um grupo distinto dos demais embriões mantidos à temperatura 18 °C constante, que por sua vez formaram dois grupos de embriões (Figura 13A). Esta separação está relacionada principalmente às alterações no ML, que apresentou coeficiente de correlação -0,897 no Fator 1, o qual explica 44,30% das dispersões na matriz (Figura 13B). O Fator 2 explica 38,65% das dispersões, demonstrando que o ETL também apresentou alterações ao longo do desenvolvimento, com coeficiente de correlação -0,927.

Tabela 1 Análise de regressão das características morfológicas dos embriões de *Octopus vulgaris* Tipo II entre os estágios de desenvolvimento para cada tratamento: 18 °C constante e temperatura rampa (18-24 °C). n=350 embriões. Slope das linhas de tendências: ns – não significativo. * significativo. Valores de média e desvio padrão. Anova One-way entre os tratamentos.

Tratamento	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	R ²	Média (mm)	Desvio Padrão (mm)
Comprimento do Ovo = a (estágio) + b						
18 °C	0,0029 ^{ns}	2,4916 [*]		0,4301	2,534	0,022
Rampa	0,0096 [*]	2,4265 [*]		0,7554	2,554	0,055
<i>DFd</i> = 13; <i>F</i> = 0,68; <i>P</i> = 0,42						
Comprimento Total do Embrião = $ae^{b(\text{estágio})}$						
18 °C	1,7311 [*]	0,0083 ^{ns}		0,281	1,958	0,155
Rampa	1,5432 [*]	0,0219 [*]		0,937	2,081	0,234
<i>DFd</i> = 13; <i>F</i> = 1,160; <i>P</i> = 0,30						
Diâmetro do Olho = $a(\text{estágio})^2 + b(\text{estágio}) + c$						
18 °C	-0,0047 ^{ns}	0,1479 ^{ns}	-0,9127 ^{ns}	0,8398	0,213	0,032
Rampa	-0,0021 [*]	0,0668 [*]	-0,2743 [*]	0,9684	0,231	0,026
<i>DFd</i> = 9; <i>F</i> = 0,800; <i>P</i> = 0,39						
Comprimento do Braço = $ae^{b(\text{estágio})}$						
18 °C	0,1498 ^{ns}	0,0485 ^{ns}		0,6289	0,353	0,045
Rampa	0,2109 [*]	0,029 ^{ns}		0,8203	0,338	0,033
<i>DFd</i> = 9; <i>F</i> = 0,294; <i>P</i> = 0,60						
Comprimento do Manto = $ae^{b(\text{estágio})}$						
18 °C	0,2898 ^{ns}	0,0797 [*]		0,8847	1,187	0,198
Rampa	0,1246 [*]	0,1388 [*]		0,9947	1,251	0,413
<i>DFd</i> = 9; <i>F</i> = 0,078; <i>P</i> = 0,78						
Volume do Vitelo = $a + b \ln(\text{estágio})$						
18 °C	1,0851 ^{ns}	-0,303 [*]		0,8875	0,299	0,138
Rampa	0,9605 [*]	-0,241 [*]		0,9313	0,358	0,110
<i>DFd</i> = 13; <i>F</i> = 0,652; <i>P</i> = 0,43						

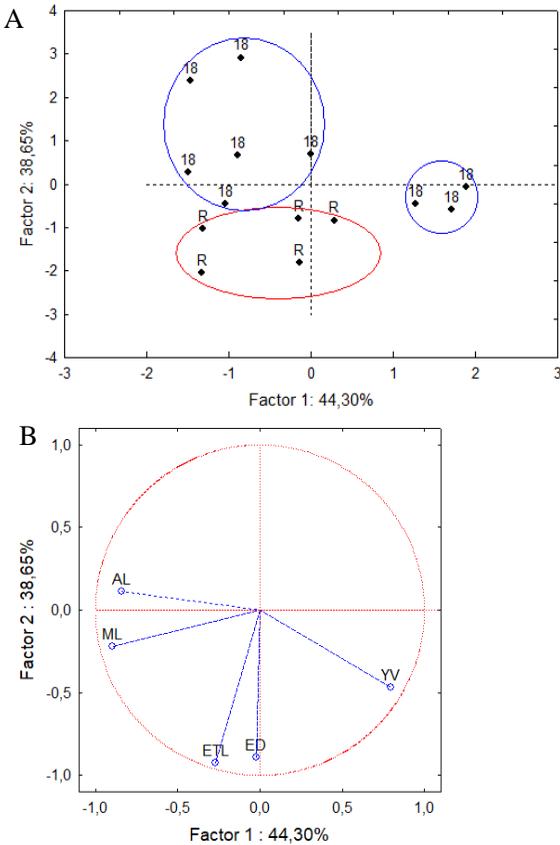
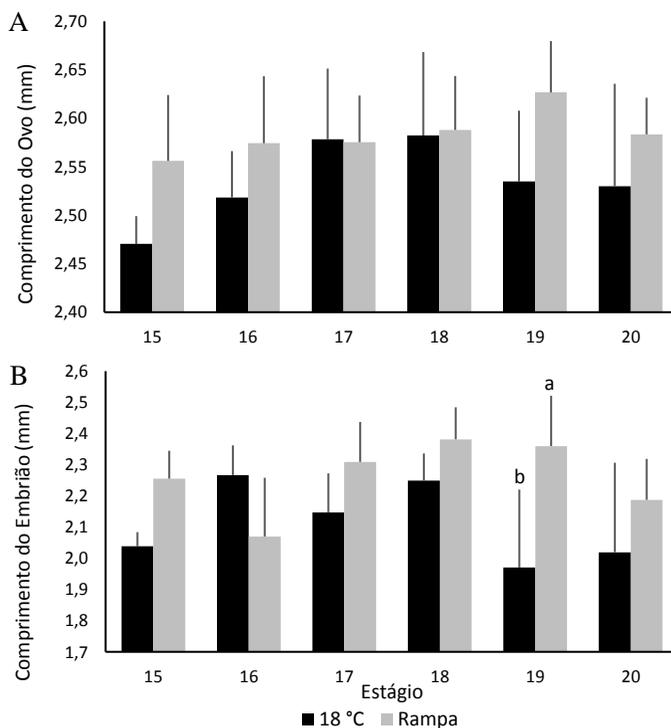


Figura 13 Análise de componentes principais (PCA) da morfometria dos embriões de *Octopus vulgaris* Tipo II. Matriz de casos indicando a distribuição das variáveis em cada tratamento: 18 °C constante e temperatura rampa (18-24 °C) (A). n=350 embriões. Vetores das variáveis correlacionadas por Fator (B). Fator 1: ML -0,897, AL -0,841, YV 0,794, ETL -0,269, ED -0,023. Fator 2: ETL -0,927, ED -0,892, YV -0,466, ML -0,217, AL 0,112.

O ML e consequentemente o ETL demonstram ser bons indicativos de alterações de crescimento nos embriões. Os embriões mantidos na temperatura rampa apresentaram maior crescimento nos estágios XVIII (Figura 14B, $P < 0,05$). O ML foi a variável que apresentou crescimento exponencial nos dois tratamentos (Tabela 1), porém os embriões mantidos na rampa apresentaram maior desenvolvimento do manto nos estágios XVIII e XIX (Figura 14D, $P < 0,05$). Os embriões incubados na temperatura rampa,

morfometricamente, apresentaram maior crescimento em relação aos embriões mantidos à temperatura 18 °C (Figura 14B, $P < 0,05$), que mostraram crescimento desuniforme e lento, demonstrando maior dispersão na matriz de casos na PCA (Figura 13A). Os embriões mantidos à temperatura 18 °C apresentaram crescimento negativo nos estágios XIX e XX (Figura 14B, $P < 0,05$). O AL não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 14C, $P > 0,05$). O ED apresentou crescimento negativo nos embriões mantidos na temperatura 18 °C, com menor diâmetro nos estágios XIX e XX (Figura 14E, $P < 0,05$). O EL no estágio XIX apresentou maior comprimento na temperatura rampa, enquanto na temperatura 18 °C no mesmo estágio o comprimento foi reduzido (Figura 14A, $P < 0,05$).



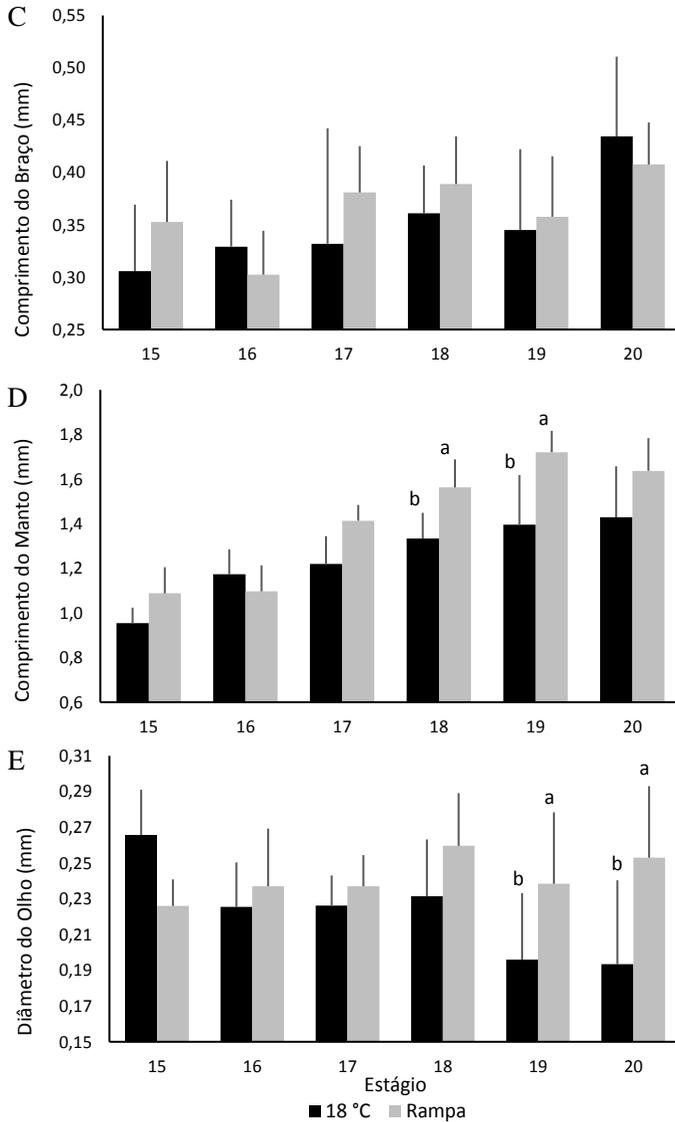


Figura 14 Mudanças morfométricas após a organogênese nos embriões de *Octopus vulgaris* Tipo II mantidos à temperatura 18 °C constante (barras pretas) e temperatura rampa (18-24 °C) (barras cinza). Valores de média e desvio padrão. n=132 embriões. Estágios de desenvolvimento descritos por Naef (1928). ANOVA Fatorial. Letras indicam estágios de desenvolvimento que apresentaram diferença estatística pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

O YV não apresentou diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 1, $P > 0,05$) ao longo do desenvolvimento dos embriões. No tratamento rampa, quando os embriões atingiram o estágio XIX, haviam consumido 57,95% do vitelo enquanto os embriões mantidos à temperatura 18 °C constante consumiram 73,66% (Figura 15).

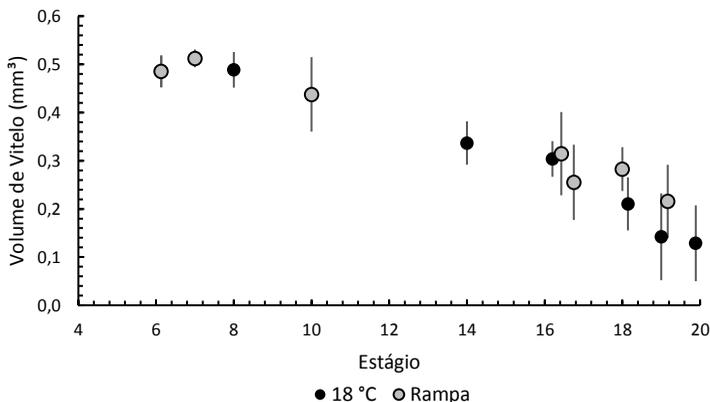


Figura 15 Efeito da temperatura no volume de vitelo (mm^3) de embriões de *Octopus vulgaris* Tipo II. Embriões incubados à temperatura 18 °C constante (círculos preto) e temperatura rampa (18-24 °C) (círculos cinza). Valores de média e desvio padrão. $n=350$ embriões. Estágios de desenvolvimento descrito por Naef (1928).

2.4 DISCUSSÃO

Devido ao comportamento termorregulador e metabólico apresentado pelos embriões na temperatura 18 °C constante, segundo o modelo de tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio (OCLTT), nossos resultados sugerem que 18 °C seja uma temperatura *pejus* para o desenvolvimento embrionário do polvo *O. vulgaris* Tipo II. Os embriões incubados nesta temperatura não conseguiram compensar o estresse térmico, aumentando os níveis de proteínas oxidadas (PO) quando o sistema de defesa antioxidante foi deprimido nos estágios avançados de desenvolvimento, o que pode ter provocado o subdesenvolvimento dos embriões. Com base na tolerância térmica crítica dependente do tempo de exposição (Pörtner e Knust, 2007; Pörtner, 2001, 2010), a temperatura *pejus* delinea o início da limitação de tempo ao estresse térmico. Em temperaturas *pejus* mínima, a capacidade metabólica diminui devido à perda de ventilação e

frequência cardíaca, reduzindo a capacidade das mitocôndrias em produzir energia devido ao baixo suprimento de oxigênio nos níveis críticos de hipóxia (Pörtner *et al.*, 1998; Pörtner, 2001). Neste caso, os embriões mantidos a 18 °C, experimentaram uma carga térmica da temperatura *pejus* (T_p) ao longo do seu desenvolvimento, que desencadeou num processo de resistência, com baixa atividade metabólica até o limite térmico crítico ser atingido, com início do metabolismo anaeróbio e inibição dos mecanismos antioxidantes.

Na temperatura rampa, o desenvolvimento dos embriões foi favorecido enquanto estiveram expostos à temperaturas ótimas, apresentando maior comprimento do manto e do embrião. Na temperatura de 22 °C no estágio XVII, os embriões conseguiram compensar o incremento de temperatura reduzindo os níveis de proteínas oxidadas (PO). A partir de 23 °C no estágio XVIII, o fornecimento de ATP foi reduzido e as defesas antioxidantes elevadas, apresentando máxima atividade dos mecanismos de proteção celular, sinalizando faixa *pejus*. No estágio XIX na temperatura de 24 °C, o metabolismo dos embriões aumentou 94% em relação ao estágio XVIII, com falência do metabolismo aeróbio e inibição do sistema de defesa antioxidante, atingindo condições de temperatura crítica. Resultados similares foram encontrados por Sanchez-García *et al.* (2017) para embriões de *O. maya*, onde a causa de mortalidade dos embriões expostos ao estresse térmico foi a perda de mecanismos fisiológicos de proteção celular, quando o metabolismo respiratório foi aumentado. Em temperaturas elevadas, o vazamento de prótons (H^+) pela membrana interna da mitocôndria, leva ao aumento do consumo de oxigênio para suprir a produção de ATP através da fosforilação oxidativa, que contribui para o aumento do metabolismo basal (Pörtner, 2001). Ou seja, até a temperatura de 23 °C, os embriões de *O. vulgaris* Tipo II apresentaram mecanismos fisiológicos para compensar as demandas metabólicas e manter a atividade antioxidante, desde que o tempo de exposição não exceda os limites de tolerância crítica.

As análises metabólicas deste estudo corroboram com Rosa *et al.* (2004, 2005), pois o fornecimento de energia ao longo do desenvolvimento embrionário até o estágio XVIII, em ambos tratamentos, foi mobilizado pela proteína, colesterol e triglicerídeos, indicando condições de metabolismo aeróbio. Os lipídeos são importantes fornecedores de ácidos graxos essenciais como docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA), ricos em fosfolipídeos e colesterol, utilizados como componentes na membrana plasmática e precursores para síntese de hormônios. No estágio XIX, os

embriões nos dois tratamentos apresentaram depressão metabólica, passando de um estado aeróbio para anaeróbio, com mobilização da glicose e do lactato para produção de ATP (Rosa *et al.*, 2004, 2005; Pörtner, 2010; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2017). Nesta fase, ocorre a segunda inversão dos embriões (Mangold, 1983; Castro-Fuentes *et al.*, 2002), onde as estimulações mecânicas demandam maior gasto energético para o embrião voltar a posição inicial e eclodir. Assim, os embriões neste estágio apresentam limitada capacidade resposta em compensar o estresse oxidativo para temperaturas além da *pejus*, associada à atividade muscular forçada e os processos de hipoxemia.

A depressão metabólica é uma estratégia importante para economizar energia observada nos moluscos marinhos em resposta à sensibilidade térmica quando os níveis de oxigênio são críticos (*Pc*) (Sokolova e Pörtner, 2001; Marshall e McQuaid, 2011; Rosa *et al.*, 2013). Neste contexto, o hipometabolismo é induzido de forma a minimizar o consumo de energia, bem como garantir a sobrevivência durante o estágio de hipercapnia ou hipóxia a curto prazo na faixa péssimo. No entanto, essa mudança metabólica não forneceu energia suficiente aos embriões de *O. vulgaris* Tipo II durante as estimulações forçadas no estágio XIX, pois o turnover de ATP através do metabolismo anaeróbio é menos eficiente quando comparado ao metabolismo aeróbio (Sokolova e Pörtner, 2001; Berg *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2013). Assim, para suprir a demanda energética, os embriões elevaram ao máximo a atividade metabólica, o que demonstra maior vulnerabilidade às condições abióticas estressantes nesta fase de pré-eclosão.

A depressão metabólica e o estado de hipóxia durante o estresse térmico foram as principais causas para eclosões prematuras em embriões de *Sepia officinalis* (Rosa *et al.*, 2013), *L. vulgaris* (Rosa *et al.*, 2012) e *O. vulgaris sensu stricto* (Repolho *et al.*, 2014), quando submetidas à condições de aquecimento. No presente estudo, foi observado que o estresse hipóxico no estágio XIX dos embriões de *O. vulgaris* Tipo II mantidos no tratamento rampa, levou ao alongamento do comprimento do ovo. Segundo Cronin e Seymour (2000), o aumento da área de superfície do ovo com redução da espessura da membrana, é uma estratégia para aumentar o fluxo de oxigênio por meio de difusão para o embrião. Desta forma, sugerimos que as paredes do ovo menos espessas durante o estresse hipóxico, podem ter influenciado nas eclosões prematuras durante a segunda inversão do embrião no tratamento rampa.

Nos embriões de *O. vulgaris* Tipo II, o sistema de defesa antioxidante começou a ser induzido no início da organogênese, aumentando gradualmente sua atividade conforme foi a construção dos tecidos durante os processos morfogenéticos. No estágio XVI, a cascata oxidativa estava completa, concomitante ao funcionamento do sistema circulatório e início da atividade cardíaca, onde os embriões apresentam maior alcance aeróbio na curva de performance térmica (TCP) (Tremblay *et al.*, 2017). Desta forma, os níveis de glutatona (GST e GSH) e carboxilase (CBE) observados no estágio VI nos dois tratamentos estudados, provavelmente tenham origem materna. O aumento na concentração de lipídeos peroxidados (LPO) observado no estágio VIII em embriões mantidos à 18 °C, indica que os embriões podem sofrer estresse térmico no início da organogênese, com redução gradual conforme foi ocorrendo a ativação do sistema antioxidante.

Nos embriões de *O. vulgaris sensu stricto* e de *L. vulgaris*, o sistema de defesa antioxidante e de proteção ao choque térmico foram observadas nos estágios avançados de desenvolvimento e nas paralarvas recém eclodidas (Rosa *et al.*, 2012; Repolho *et al.*, 2014). Em embriões de *O. maya*, o funcionamento da atividade antioxidante também foi induzida durante a organogênese. Entretanto, os embriões expostos a variação térmica de 1 °C a cada 5 dias, não conseguiram reduzir sua sensibilidade térmica quando o metabolismo respiratório foi aumentado e os mecanismos de defesa deprimidos (Sanchez-García *et al.*, 2017). Nos embriões de *O. vulgaris* Tipo II, o sistema antioxidante demonstrou-se eficiente na temperatura rampa, mantendo baixos níveis de PO e LPO, até sua atividade ser suprimida quando a temperatura crítica foi atingida à 24 °C. Na temperatura 18 °C constante, o sistema antioxidante não alcançou a compensar a produção de ROS ao longo do desenvolvimento dos embriões, sendo deprimida no estágio XVIII e suprimida ao atingir o limite térmico crítico no estágio XIX. Na faixa péssimo, o metabolismo torna-se independente da temperatura e todo o ATP produzido é direcionado a reparar danos celulares provocados pelos estresse oxidativo (Pörtner, 2010).

O funcionamento do sistema antioxidante é dependente da glutatona total (GSH), pois atua como eliminador direto de ROS ou como cofator da GST durante a desintoxicação xenobiótica. Dentro da cascata antioxidante, a GSH é reconvertida pela glutatona oxidada (GSSG) através da glutatona redutase (GR), utilizando NADH como redutor de elétrons. As moléculas de NADH são importantes para manter o equilíbrio REDOX celular e a fosforilação oxidativa na síntese de ATP. Para manter os níveis energéticos dissipados na forma de calor

e o gradiente de elétrons na cadeia respiratória, o embrião utiliza reservas vitelinas como fonte de energia. Neste caso, a carboxilase (CBE) desempenha papel importante na degradação e liberação de ácidos graxos para a síntese de ATP na fosforilação oxidativa e produção de NADH no Ciclo do Ácido Cítrico e no Ciclo das Pentoses. A CBE é uma enzima alostérica, inibida ou ativada pela fosforilação oxidativa (Berg *et al.*, 2010; Regoli *et al.*, 2011a, 2011b; Regoli e Giuliani, 2014). Por isso, a manutenção do sistema de defesa antioxidante se torna energeticamente inviável aos embriões termicamente estressados quando a demanda metabólica é aumentada, pois a exigência de NADH para manter a atividade da GSH e a síntese de ATP, necessita maior mobilização de ácidos graxos para sustentar os níveis energéticos celular.

As alterações no diâmetro do olho induzidas pela temperatura observadas nos embriões de *O. vulgaris* Tipo II, também foram visualizadas em embriões de *O. mimus* (Uriarte *et al.*, 2012) e *O. maya* (Caamal-Monsreal *et al.*, 2016) quando expostos à temperaturas além das ideais. Os olhos nos embriões por estarem conectados ao sistema nervoso central são caracterizados como órgãos cefálicos, visíveis no início da organogênese ao serem formados pelas camadas ectodérmicas (Boletzky, 2003). Sanchez-García *et al.* (2017) constataram que o incremento de temperatura acelerou a formação do sistema nervoso nos embriões de *O. maya*, resultando em variações no diâmetro do olho e alterações bioquímicas devido a atividade precoce da acetilcolinesterase (AChE). Isso indica que o sistema nervoso dos embriões é extremamente sensível à temperaturas extremas. Neste trabalho, observamos que o estresse térmico sofrido pelos embriões mantidos na temperatura 18 °C constante, afetou negativamente a formação do sistema nervoso, pois o diâmetro do olho foi reduzido concomitante ao aumento de atividade da AChE, quando o sistema antioxidante foi deprimido. A AChE é uma enzima independente do sistema antioxidante, cuja atividade está relacionada ao funcionamento do sistema nervoso central e funções neuromusculares, permitindo que os neurônios retornem ao estado de repouso após ativação. Porém, a sua regulação é prejudicada pelo estresse oxidativo (Schallreuter *et al.*, 2004; Rico *et al.*, 2007; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2015). Por isso a AChE é considerada um bioindicador antigo, usado para demonstrar alterações no sistema nervoso dos organismos quando induzidas por fatores ambientais estressantes (Payne *et al.*, 1996).

Ao contrário de Moxica *et al.* (1999) e Repolho *et al.* (2014), que obtiveram melhor desempenho zootécnico em embriões de *O. vulgaris*

sensu stricto quando incubados à temperatura de 18 °C; este estudo demonstra que a temperatura de 18 °C não foi adequada para o desenvolvimento embrionário da espécie *O. vulgaris* Tipo II. Esse estudo mostra que as espécies *O. vulgaris sensu stricto* e *O. vulgaris* Tipo II, apresentam intervalos distintos de temperatura para o desenvolvimento embrionário, baseada na plasticidade fenotípica dentro das condições ambientais as quais cada espécie evoluiu (Caverivière *et al.*, 1999; Cabranes *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2010; Amor *et al.*, 2017). Portanto, esta é uma questão importante a ser considerada quando for debatido sobre a aquicultura das espécies do complexo *O. vulgaris*, onde novos estudos podem ser realizados para descrever em qual temperatura os embriões de *O. vulgaris* Tipo II apresentam melhor desempenho zootécnico.

A separação em dois grupos dos embriões de *O. vulgaris* Tipo II, incubados à temperatura 18 °C na matriz de casos da PCA (Figura 13A), indica que os embriões apresentaram desempenho individual diferente ao estresse térmico que foram submetidos. Essa diferença ocorreu no desenvolvimento morfométrico, pois mesmo sob condições estressantes, um grupo de embriões conseguiu converter energia e apresentar crescimento positivo, porém não satisfatório devido às deformidades apresentadas. Em geral, os embriões mantidos à 18 °C apresentaram crescimento lento, irregular e subdesenvolvimento, com baixa taxa de eclosão e mortalidade. Segundo Pörtner e Knust (2007) curvas de crescimento desequilibradas resultam no aumento do alcance aeróbio concomitante ao aumento metabólico basal, afetando o crescimento além das temperaturas *pejus*. Para manter a atividade antioxidante dentro de um ambiente estressante, os embriões utilizaram 73 % das reservas vitelinas e não se desenvolveram morfometricamente. Isso pode ser visualizado pela baixa taxa de eclosão, pois os embriões com tamanho reduzido não puderam exercer pressão suficiente para romper a membrana do ovo, morrendo sem eclodir. Segundo Repolho *et al.* (2014) os mecanismos de proteção celular podem ser energeticamente caros aos embriões, pois ajustes metabólicos são necessários para manter a homeostase celular dentro de um ambiente termicamente estressante. Sanchez-García *et al.* (2017) sugerem que o aumento de 13% das taxas metabólicas em embriões de *O. maya* estressados termicamente se deu aos mecanismos fisiológicos neutralizadores de ROS.

O modelo de tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio demonstrou ser eficiente em fornecer uma base integrada de como a temperatura modula os processos metabólicos e fisiológicos nos

embriões. Neste estudo, observamos que os embriões de cada tratamento atingiram os limites térmicos críticos, desencadeando respostas fisiológicas e metabólicas através do tempo de exposição à temperatura *pejus* ou pelo aumento da temperatura até atingir a temperatura crítica, respectivamente, 18 e 24 °C. Isso sugere o possível intervalo térmico de desempenho que os embriões de *O. vulgaris* Tipo II estão adaptados (18 a 23 °C), podendo variar ao longo do seu gradiente latitudinal de distribuição ou entre diferentes populações desta espécie (Moreira *et al.*, 2011).

Até a temperatura de 23 °C os embriões de *O. vulgaris* Tipo II conseguiram compensar o estresse térmico sob condições de aquecimento. Este resultado difere do resultado obtido para embriões de *O. vulgaris sensu stricto*, com limite térmico apresentado na temperatura de 21 °C (Repolho *et al.*, 2014). Isso indica que os embriões de *O. vulgaris* Tipo II respondem a distintas temperaturas, o que ajuda a entender como as condições térmicas modulam de forma diferente cada espécie, sendo essa relação de causa e efeito, responsável pela distribuição biogeográfica das espécies (Pörtner, 1998, 2001, 2010). A aclimação fisiológica a diferentes temperaturas correlaciona-se com o aumento da diferenciação genética (Pörtner, 2001), que pode ser alcançada pela seleção evolutiva para genótipos específicos (Pörtner e Farrell, 2008). Assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a tolerância dos embriões de *O. vulgaris* Tipo II a altas temperaturas pode ser uma vantagem adaptativa para as espécies do complexo *O. vulgaris*, pois apresentam ciclo de vida curto, longevidade estimada de dois anos e comportamento reprodutivo caracterizado por paternidade múltipla, com heranças genéticas vindas dos vários indivíduos durante o período reprodutivo dos polvos.

Agradecimentos: Este trabalho foi realizado com o apoio, participação, execução e coorientação do professor *Dr. Carlos Rosas Vázquez* da Unidade Multidisciplinar de Docência e Investigação, Faculdade de Ciências, Universidade Nacional Autônoma de México, Sisal/Yucatán. Financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001, por meio dos projetos CAPES/PVE 0172/2015, CAPES/Ciências do Mar 2, PROEX/CAPES/2016.

REFERÊNCIAS

- Amor, M.D., Norman, M.D., Roura, A., Leite, T.S., Gleadall, I.G., Reid, A., Perales-Raya, C., Lu, C-C, Silvey, C.J., Vidal, E.A.G., Hochberg, F.G., Zheng, X., Strugnell, J.M., 2017. Morphological assessment of the *Octopus vulgaris* species complex evaluated in light of molecular-based phylogenetic inferences. *Zoologica Scripta*. 46, 275-288.
- Ávila-da-Silva, A.O., Assunção, R., Tomás, A.R.G., 2014. Surgimento e evolução da pesca do polvo comum, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, com potes no estado de São Paulo, BRASIL. In: Haimovici, M., Andriguetto-Filho, J.M., Sunye, P.S. (Eds), A pesca marinha e estuarina no Brasil: estudos de caso multidisciplinares. Editora da FURG, Rio Grande, pp 101-110.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21:6, 1316-1322.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2010. *Bioquímica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 1114.
- Boletzky, S.V., 1989. Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. In: Blaxter, J., Douglas, B. (Eds), *Advances in Marine Biology*. Copyright by Academic Press Limited, ISBN 0-12-026125-1, 25, pp.85-115.
- Boletzky, S.V., 1994. Embryonic development of cephalopods at low temperatures. *Antarctic Science*. 6(2), 139-142.
- Boletzky, S.V., 2003. Biology of early life stages in cephalopod molluscs. In: Southward, A.J., Tyler, P.A., Young, C.M., Fuiman, L.A. (Eds), *Advances in marine biology*. Copyright Academic Press, ISBN: 0-12-026144-8, 44, 143-200.
- Boletzky, S.V., Hanlon, R.T., 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoirs of the National Museum Victoria*. 44, 147-187.
- Boyle, P., Rodhouse, P., 2005. *Cephalopods: ecology and fisheries*. Copyright by Blackwell Science Ltd, ISBN: 9780470995310, pp. 1-367.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72, 248-254.
- Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farías, A., Díaz, F., Sánchez, A., Re, D., Rosas, C., 2016. Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*. *Aquaculture*. 451, 156–162.
- Cabranes, C., Fernandez-Rueda, P., Martínez, J. L., 2007. Genetic structure of *Octopus vulgaris* around the Iberian Peninsula and Canary Islands as indicated by microsatellite DNA variation. *ICES Journal of Marine Science*. 65, 12-16.
- Castro-Fuentes, H., Paz, O. A., Felay, A.Q., Romero, O.Z., 2002. Descripción del desarrollo embrionario y paralarva de *Octopus minus* (Gould, 1852) (Mollusca: Cephalopoda) en cautiverio. *Estudios Oceanológicos*. 21, 13-25.
- Caverivière, A., Domain, F., Diallo, A., 1999. Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal). *Aquat Living Resour*. 12(2), 151-154.
- Chédia, J., Widien, K., Amina, B., 2010. Role of sea surface temperature and rainfall in determining the stock and fishery of the common octopus (*Octopus vulgaris*, Mollusca, Cephalopoda) in Tunisia. *Marine Ecology*. 31, 431-438.
- Clarke, A., 2003. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptations. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 18:11, 573-581.
- Clarke, A., 2004. Is there a Universal Temperature Dependence of metabolism? *Functional Ecology*. 18, 252-256.
- Clarke, A., Fraser, K.P.P., 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology*. 18, 243-251.
- Cronin, E.R., Seymour, R.S., 2000. Respiration of the eggs of the giant cuttlefish *Sepia apama*. *Marine Biology*. 136, 863-870.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, J., Faetherstone, R., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*. 7, 88-95.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. Cephalopods of the world an annotated and illustrated catalogue of cephalopods species known to date. Octopods and Vampire Squids, Rome, 3, pp. 1-398.
- Haimovici, M., Andriquetto-Filho, J.M., 1986. Cefalópodes costeiros capturados na pesca de arrasto no litoral sul do Brasil. Arq. Biol. Tecnol. 29(3), 473-295.
- Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva, R. (Eds), 2014. Cephalopod Culture. Springer Science Business Media, Dordrecht, ISBN 978-94-017-8648-5, pp. 1-494.
- Juárez, O.E., Galindo-Sánchez, C.E., Díaz, F., Sánchez-García, A.M., Camaal-Monsreal, C, Rosas, C., 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 467, 71-76.
- Juárez, O.E., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C.E., Díaz, F., Re, D., Rosas, C., 2016. Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 474, 39-45.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. Numerical Ecology. Elsevier Science B.V. All rights reserved.
- Mangold, K., 1983. *Octopus vulgaris*. In: Boyle, P.R. (Eds), Cephalopod life cycle. Species Accounts, Copyright by Academic Press Limited, London, ISBN: 0-12-123001-5, 1, pp. 335-364.
- Mangold, K., Boletzky, S.V., 1973. New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris*. Marine Biology. 19, 7-12.
- Marshall, D.J., McQuaid, C.D., 2011. Warming reduces metabolic rate in marine snails: adaptation to fluctuating high temperatures challenges the metabolic theory of ecology. Proceedings of the Royal Society B. 278, 281-288.
- Mastropaolo, W., Yourno, J., 1981. An ultraviolet spectrophotometric assay for α -Naphthyl Acetate and α -Naphthyl Butyrate Esterases. Analytical Biochemistry. 115, 188-193.

- Mesquita, C.S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J., Marcos, J.C., 2014. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*. 458, 69-71.
- Moreira, A.A., Tomás, A.R.G., Hilsdorf, A.W.S., 2011. Evidence for genetic differentiation of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) fishery populations from the southern coast of Brazil as revealed by microsatellites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 407, 34-40.
- Moxica, C., Otero, J.J., Iglesias, J., Sánchez, F.J., 1999. Comportamiento reproductor, puestas y desarrollo embrionario del pulpo (*Octopus vulgaris*) em cautivadas. Instituto Español de Oceanografía. Apto. 1552. 36280. Vigo. España.
- Naef, A., 1928. Cephalopoda Embriology. Part I, Vol II (Mongraph No. 35). Fauna and Flora of the Bay of Naples. Translated by the Smithsonian Institution Libraries, Washington, DC, 35, pp. 1-461.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvon, W., Fancey, L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*. 32(2), 225-231.
- Pörtner, H.O., 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*. 88, 137-1446.
- Pörtner, H.O., 2010. Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of Experimental Biology*. 213, 881-893.
- Pörtner, H.O., Hardewig, I., Sartoris, F.J., Dijk, P.L.M., 1998. Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation? In: Pörtner, H.O., Playle, R. (Eds), *Cold ocean physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 88-120.
- Pörtner, H.O., Farrell, A.P., 2008. Physiology and climate change. *Science*. 322, 690-692.

- Pörtner, H.O., Knust, R., 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*. 315, 95-97.
- Regoli, F., Benedetti, M., Giuliani, M.E., 2011a. Antioxidant Defenses and Acquisition of tolerance to chemical stress. In: Triquet-Amiard, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds), *Tolerance to environmental contaminants*. CRC Press by Taylor & Francis Group. ISBN 978-1-4398-1770-4. pp. 153-173.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011b. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology*. 1055, 56-66.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*. 93, 106-117.
- Repolho, T., Baptista, M., Pimentel, M.S., Dionísio, G., Trübenbach, K., Lopes, V.M., Lopes, A.R., Calado, R., Diniz, M., Rosa, R., 2014. Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming. *Journal of Comparative Physiology B*. 184, 55-64.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2007. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology Letters*. 174, 25-30.
- Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., Schlenk, D., 2008. Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69(3), 466-471.
- Rodríguez-Fuentes, G., Rubio-Escalante, F.J., Noreña-Barroso, E., Escalante-Herrera, K., Schlenk, D., 2015. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, 172-173, 19-25.
- Rodríguez-Fuentes, G., Murúa-Castillo, M., Díaz, F., Rosas, C., Caamal-Monsreal, C., Sánchez, A., Paschke, K., Pascual, C., 2017. Ecophysiological biomarkers defining the thermal biology of the

- Caribbean lobster *Panulirus argus*. *Ecological Indicators*. 78, 192-204.
- Rosa, R., Costa, P.R., Nunes, M.L., 2004. Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of *Octopus vulgaris* and *O. defilippi* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Biology*. 145, 563-574.
- Rosa, R., Costa, P.R., Banderia, N., Nunes, M.L., 2005. Changes in tissue biochemical composition and energy reserves associated with sexual maturation in the Ommastrephid squids *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae*. *Marine Biological Laboratory*. 208, 100-113.
- Rosa, R., Pimentel, M.S., Boa Vida-Portugal, J., Teixeira, T., Trübenbach, K., Diniz, M., 2012. Ocean Warming Enhances Malformations, Premature Hatching, Metabolic Suppression and Oxidative Stress in the Early Life Stages of a Keystone Squid. *PLoS ONE*. Volume 7, Issue 6, e38282.
- Rosa, R., Trübenbach, K., Repolho, T., Pimentel, M., Faleiro, F., Boa Vida-Portugal, J., Baptista, M., Lopes, V.M., Dionísio, G., Leal, M.C., Calado, R., Pörtner, H.O., 2013. Lower hypoxia thresholds of cuttlefish early life stages living in a warm acidified ocean. *Proceedings of the Royal Society B*. 280, 1695.
- Sanchez-García, A., Rodríguez-Fuentes, G., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C.E., Ortega, K., Mascaró, M., López, E., Caamal-Monsreal, C., Juárez, O., Noreña-Barroso, E., Re, D., Rosas, C., 2017. Thermal sensitivity of *O. maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico. *Ecological Indicators*. 72, 574–585.
- Schallreuter, K.U., Elwary, S.M.A., Gibbons, N.C.J., Rokos, H., Wood, J.M., 2004. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 315, 502-508.
- Schulte, P.M., 2015. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *The Journal of Experimental Biology*. 218, 1856-1866.
- Sokolova, I.M., Pörtner, H.O., 2001. Physiological adaptations to high intertidal life involve improved water conservation abilities and

metabolic rate depression in *Littorina saxatilis*. Marine Ecology Progress Series. 224, 171-186.

- Tremblay, N., Caamal-Monsreal, C., Ortega, K., Díaz, F., Celdrán, D., Rosas, C., 2017. Measurement of aerobic scope during the whole embryonic development of a cephalopod. Date Publisher for Earth & Environmental Science. Supplement to: Tremblay, N. *et al.* (in review): Measurement of aerobic scope during the whole embryonic development of a cephalopod. Marine Biology. PANGAEA. <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.873863>.
- Uriarte, I., Espinoza, V., Herrera, M., Zúñiga, O., Olivares, A., Carbonell, P., Pino, S., Farías, A., Rosas, C., 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 416-417, 168-175.
- Uriarte, I., Martínez-Montañón, E., Espinoza, V., Rosas, C., Hernández, J., Farías, A., 2016. Effect of temperature increase on the embryonic development of Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus* in controlled culture. Aquaculture Research. 47, 2582–2593.
- Vidal, E.A.G., Dimarco, F.P., Wormuth, J.H., Lee, P.G., 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. Bulletin of Marine Science. 71(2), 915-931.
- Vidal, E.A.G., Fuentes, L., Silva, L.B., 2010. Definig *Octopus vulgaris* populations: a comparative study of the morphology and chromatophore pattern of paralarvae from Northeastern and Southwestern Atlantic. Fisheries Research. 106, 199-208.
- Vidal, E.A.G (Eds), 2014. Advances in marine biology. Advances in cephalopod science: biology, ecology, cultivation and fisheries. Copyright Elsevier Ltd, ISBN: 978-0-12-800287-2, pp. 1-479.
- Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., Madeira, D., Narciso, L., Diniz, M., Flores, A.A.V., 2016. Vulnerability to climate warming and acclimation capacity of tropical and temperate coastal organisms. Ecological Indicators. 62, 317–327.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AMOR, M.D.; NORMAN, M.D.; ROURA, A.; LEITE, T.S.; GLEADALL, I.G.; REID, A.; PERALES-RAYA, C.; LU, C-C; SILVEY, C.J.; VIDAL, E.A.G.; HOCHBERG, F.G.; ZHENG, X.; STRUGNELL, J.M. **Morphological assessment of the *Octopus vulgaris* species complex evaluated in light of molecular-based phylogenetic inferences.** *Zoologica Scripta*. 46, 275-288, 2017.

ARCHIDIACONO, A.M. **Caracterização da cadeia produtiva da pesca de polvos com potes no estado de São Paulo.** Dissertação de Mestrado: Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Governo do Estado de São Paulo. 84p, 2007.

ASSUNÇÃO, R. **Análise da influência das variáveis pesqueiras e ambientais na abundância do polvo-comum *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797), descarregado no estado de São Paulo entre 2003-2011.** Dissertação de Mestrado: Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Governo do Estado de São Paulo. 85p, 2012.

ÁVILA-DA-SILVA, A.O.; ASSUNÇÃO, R.; TOMÁS, A.R.G. **Surgimento e evolução da pesca do polvo comum, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, com potes no estado de São Paulo, BRASIL.** In: HAIMOVICI, M.; ANDRIGUETTO-FILHO, J.M.; SUNYE, P.S. (Eds). *A pesca marinha e estuarina no Brasil: estudos de caso multidisciplinares.* Editora da FURG. Rio Grande. 191p, 2014.

BASTOS, P.T.; BRANDÃO, A.G.; FERREIRA, J.F.; MELO, C.M.R. **Engorda do polvo *Octopus vulgaris* em gaiolas flutuantes de pequeno volume.** *Revista Agropecuária Catarinense: Florianópolis.* Volume 27, 51-53, 2014.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica.** Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

BOLETZKY, S.V. **Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda.** In: BLAXTER, J.;

DOUGLAS, B. (Eds) *Advances in Marine Biology*. Copyright by Academic Press Limited. ISBN 0-12-026125-1. Volume 25, 85-115, 1989.

BOLETZKY, S.V. **Embryonic development of cephalopods at low temperatures**. *Antarctic Science*. 6(2), 139-142, 1994.

BOLETZKY, S.V. **Yolk sac morphology in cephalopod embryos**. In: SUMMESBERGER, H.; HISTON, K.; DAURER, A. (Eds). *Cephalopods present and past*. Volume 57. *Abhandlungen der Geologischen Bundesanstalt*. 57-68, 2002.

BOLETZKY, S.V. **Biology of early life stages in cephalopod molluscs**. In: SOUTHWARD, A.J.; TYLER, P.A.; YOUNG, C.M.; FUIMAN, L.A. (Eds). *Advances in marine biology*. Copyright Academic Press. ISBN: 0-12-026144-8. Volume 44, 143-200, 2003.

BOLETZKY, S.V.; HANLON, R.T. **A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs**. *Memoirs of the National Museum Victoria*. 44, 1983.

BOYLE, P.; RODHOUSE, P. **Cephalopods: ecology and fisheries**. Copyright by Blackwell Science Ltd. ISBN: 9780470995310. 367p, 2005.

BRASIL. Decreto n° 3.179, de 21 de setembro de 1999. **Dispõe sobre a especificação das sanções aplicáveis às condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências.**

BRASIL. Decreto n° 6.514, de 22 de julho de 2008. **Dispõe sobre as infrações e sanções administrativas ao meio ambiente, estabelece o processo administrativo federal para apuração destas infrações, e dá outras providências.**

BRASIL. Decreto n° 9.004, de 13 de março de 2017. **Transfere a Secretaria de Aquicultura e Pesca do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Secretaria Especial da Micro e Pequena Empresa da Secretaria de Governo da Presidência da República para o Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, e dá outras providências.**

BRASIL. Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009. **Dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, regula as atividades pesqueiras, revoga a Lei nº 7.679, de 23 de novembro de 1988, e dispositivos do Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967, e dá outras providências.**

CAAMAL-MONSREAL, C.; URIARTE, I.; FARIÁS, A.; DÍAZ, F.; SÁNCHEZ, A.; RE, D.; ROSAS, C. **Effects of temperature on embryo development and metabolism of *O. maya*.** Aquaculture. 451, 156–162, 2016.

CABRANES, C.; FERNANDEZ-RUEDA, P.; MARTÍNEZ, J. L. **Genetic structure of *Octopus vulgaris* around the Iberian Peninsula and Canary Islands as indicated by microsatellite DNA variation.** ICES Journal of Marine Science. 65, 12-16, 2007.

CASTANHARI, G. **Utilização de anéis etários para estudo de crescimento em mandíbulas do polvo-comum *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) na costa brasileira entre Cabo Frio (23° S) e Cabo de Santa Marta Grande (29° S), Brasil.** Dissertação de Mestrado: Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca. Instituto de Pesca. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Governo do Estado de São Paulo. 69p, 2007.

CASTRO-FUENTES, H.; PAZ, O. A.; FELAY, A.Q.; ROMERO, O.Z. **Descripción del desarrollo embrionario y paralarva de *Octopus minus* (Gould, 1852) (Mollusca: Cephalopoda) en cautiverio.** Estudios Oceanológicos. 21, 13-25, 2002.

CAVERIVIÈRE, A.; DOMAIN, F.; DIALLO, A. **Observations on the influence of temperature on the length of embryonic development in *Octopus vulgaris* (Senegal).** Aquat Living Resour. 12 (2), 151 – 154, 1999.

CHAPELA, A.; GONZÁLEZ, A.F.; DAWE, E.G.; ROCHA, F.J.; GUERRA, A. **Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts.** Scientia Marina. 70 (1), 121-129, 2006.

CLARKE, A. **Costs and consequences of evolutionary temperature adaptations.** *TRENDS in Ecology and Evolution.* 18:11, 573-581, 2003.

CLARKE, A. **Is there a Universal Temperature Dependence of metabolism?** *Functional Ecology.* 18, 252-256, 2004.

CLARKE, A.; FRASER, K.P.P. **Why does metabolism scale with temperature?** *Functional Ecology.* 18, 243-251, 2004.

COSTA, P.A.S.; HAIMOVICI, M. **A pesca de polvos e lulas no litoral do Rio de Janeiro.** *Ciência e Cultura (Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência).* 42(12), 1124-1130, 1990.

DAAN, S.; MASMAN, D.; GROENEWOLD, A. **Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature.** *The American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 259, 333-340, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Cephalopods of the world an annotated and illustrated catalogue of cephalopods species known to date.** Volume 3. Octopods and Vampire Squids. Rome. 398p, 2016a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Fishery and aquaculture statistics. Aquaculture production.** Yearbook, 2018.

GASALLA, M.A.; POSTUMA, F.A.; TOMÁS, A.R.G. **Captura de lulas (Mollusca: Cephalopoda) pela pesca industrial desembarcada em Santos: comparação após 4 décadas.** *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology.* 9(2), 5-8, 2005.

GASCUEL, D.; LABROSSE, P.; MEISSA, B.; TALEB-SIDI, M.O.; GUÉNETTE, S. **Decline of demersal resources in North-West Africa: an analysis of Mauritanian trawl-survey data over the past 25 years.** *African Journal of Marine Science.* 29(3), 331–345, 2007.

GRASSI, R.T.B.; FRANÇA, L.F.; TANJI, S. **Experimentação do uso de potes para a captura de polvo no litoral paulista durante o ano de 1974/75**. SITC. São Paulo. (1):21-44, 1976.

GUERRA, A. **Determinación de las diferentes fases del desarrollo sexual de *Octopus vulgaris* Lamarck, mediante um índice de madurez**. Inv. Pesq. 39(2), 397-416, 1975.

HAZIN, H.G.; LANG, M.T.; TARIGOI, R.H.; SOUZA, T.G.; CABRAL, D.Q. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011**. Coordenação Geral de Monitoramento e Informações Pesqueiras. Secretaria de Monitoramento e Controle do Ministério da Pesca e Aquicultura. 60p, 2011.

IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F.J.; OTERO, J.J. **Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris*) en el Instituto Español de Oceanografía**. Anais: COSTA, J.; ABELLAN, E.; GARCÍA, B.; ORTEGA, A.; ZAMARA, S. (Eds). VII Congreso Nacional de Acuicultura. Cartagena. ISBN: 84-491-0323. 221–226, 1997.

IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F.J.; OTERO, J.J.; MOXICA, C. **Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): present knowledge, problems and perspectives**. Recent advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. CIHEAM.-Cahiers Options Méditerranéennes. 47, 313– 321, 2000.

IGLESIAS, J.; OTERO, J.J.; MOXICA, C.; FUENTES, L.; SÁNCHEZ, F.J. **The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions: paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age**. Aquaculture International. 12, 481-487, 2004.

IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F.J.; BERSANO, J.G.F.; CARRASCO, J.F.; DHONT, J.; FUENTES, L.; LINARES, F.; MUÑOZ, J.L.; OKYMURA, S.; ROO, J.; VAN-DER-MEEREN, T.; VIDAL, E.A.G.; VILLANUEVA, R. **Rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae: present status, bottlenecks and trends**. Aquaculture. 266, 1-15, 2007.

IGLESIAS, J.; FUENTES, L.; VILLANUEVA, R. (Eds). **Cephalopod Culture**. Springer Science Business Media Dordrecht. ISBN 978-94-017-8648-5. 494p, 2014.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE.
Summary for policymakers. In: Climate change 2013. The physical science basis. Working group I contribution to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. World Meteorological Organization. 2013.

JUÁREZ, O.E.; GALINDO-SÁNCHEZ, C.E.; DÍAZ, F.; SÁNCHEZ-GARCÍA, A.M.; CAMAAL-MONSREAL, C; ROSAS, C. **Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness?** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 467, 71-76, 2015.

JUÁREZ, O.E.; HAU, V.; CAAMAL-MONSREAL, C.; GALINDO-SÁNCHEZ, C.E.; DÍAZ, F.; RE, D.; ROSAS, C. **Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change**. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 474, 39–45, 2016.

MANGOLD, K. ***Octopus vulgaris***. In: BOYLE, P.R (Eds). Cephalopod life cycle. Species Accounts. Copyright by Academic Press Limited. ISBN: 0-12-123001-5. Volume I, 1983.

MANGOLD, K.; BOLETZKY, S.V. **New data on reproductive biology and growth of *Octopus vulgaris***. Marine Biology. 19, 7-12, 1973.

MOGUEL, C.; MASCARÓ, M.; AVILA-POVEDA, O.H.; CAAMAL-MONSREAL, C.; SANCHEZ, A.; PASCUAL, C.; ROSAS, C. **Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system**. Aquatic Biology. 9, 35-48, 2010.

NAEF, A. 1928. **Cephalopoda Embriology**. Part I, Vol II (Mongraph No. 35). Fauna and Flora of the Bay of Naples. Translated by the Smithsonian Institution Libraries, Washington, DC. 35, pp. 1-461, 1928.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos.** Roma. 224p, 2016.

PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVON, W.; FANCEY, L. **Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new furute? Field trials in association with two urban rivers and paper mill in Newfoundland.** Marine Pollution Bulletin. 32(2), 225-231, 1996.

PÖRTNER, H.O. **Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems.** The Journal of Experimental Biology. 213, 881-893, 2010.

REGOLI, F.; BENEDETTI, M.; GIULIANI, M.E. **Antioxidant Defenses and Acquisition of tolerance to chemical stress.** In: TRIQUET-AMIARD, C.; RAINBOW, P.S.; ROMÉO, M. (Eds) Tolerance to environmental contaminants. CRC Press by Taylor & Francis Group. ISBN 978-1-4398-1770-4. 437p, 2011a.

REGOLI, F.; GIULIANI, M.E.; BENEDETTI, M.; ARUKWE, A. **Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues.** Aquatic Toxicology. 1055, 56-66, 2011b.

REGOLI, F.; GIULIANI, M.E. **Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms.** Marine Environmental Research. 93, 106-117, 2014.

REPOLHO, T.; BAPTISTA, M.; PIMENTEL, M.S.; DIONÍSIO, G.; TRÜBENBACH, K.; LOPES, V.M.; LOPES, A.R.; CALADO, R.; DINIZ, M.; ROSA, R. **Developmental and physiological challenges of octopus (*Octopus vulgaris*) early life stages under ocean warming.** Journal of Comparative Physiology B. 184, 55–64, 2014.

RICO, E.P.; ROSEMBERG, D.B.; DIAS, R.D.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. **Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain.** Toxicology Letters. 174, 25-30, 2007.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; RUBIO-ESCALANTE, F.J.; NOREÑA-BARROSO, E.; ESCALANTE-HERRERA, K.; SCHLENK, D.

Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, 172-173, 19-25, 2015.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; MURÚA-CASTILLO, M.; DÍAZ, F.; ROSAS, C.; CAAMAL-MONSREAL, C.; SÁNCHEZ, A.; PASCHKE, K.; PASCUAL, C. **Ecophysiological biomarkers defining the termal biology of the Caribbean lobster *Panulirus argus*.** Ecological Indicators. 78, 192-204, 2017.

ROSA, R.; PIMENTEL, M.S.; BOAVIDA-PORTUGAL, J.; TEIXEIRA, T.; TRÜBENBACH, K.; DINIZ, M. **Ocean Warming Enhances Malformations, Premature Hatching, Metabolic Suppression and Oxidative Stress in the Early Life Stages of a Keystone Squid.** PLoS ONE. Volume 7, Issue 6, e38282, 2012.

ROSAS, C.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; PASCUAL, C.; TABOADA, G.; ARENA, L.; VANWORMHOUDT, A. **An energetic and conceptual modelo of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 268, 47-67, 2002.

ROSAS, C.; GALLARDO, P.; MASCARÓ, M.; CAAMAL-MONSREAL, C.; PASCUAL, C. ***Octopus maya*.** In: IGLESIAS, J.; FUENTES, L.; VILLANUEVA, R. (Eds). Cephalopod Culture. Springer Science Business Media, Dordrecht. ISBN 978-94-017-8648-5. 494P, 2014.

SÁNCHEZ GARCÍA, A.M. **Efecto del increment de la temperature en el desarrollo y estado fisiológico de embriones de *Octopus maya* (Voss & Solís Ramírez, 1966) y *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797.** Tesis de Maestría: Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. Unidad Académica Sisal, Yucatán. Universidade Nacional Autónoma de México. 149p, 2016.

SANCHEZ-GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; DÍAZ, F.; GALINDO-SÁNCHEZ, C.E.; ORTEGA, K.; MASCARÓ, M.; LÓPEZ, E.; CAAMAL-MONSREAL, C.; JUÁREZ, O.; NOREÑA-BARROSO,

E.; RE, D.; ROSAS, C. **Thermal sensitivity of *O. maya* embryos as a tool for monitoring the effects of environmental warming in the Southern of Gulf of Mexico.** Ecological Indicators. 72, 574–585, 2017.

SCHALLREUTER, K.U.; ELWARY, S.M.A.; GIBBONS, N.C.J.; ROKOS, H.; WOOD, J.M. **Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 315, 502-508, 2004.

SCHULTE, P.M. **The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment.** The Journal of Experimental Biology. 218, 1856-1866, 2015.

SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Instrução Normativa SEAP/PR n° 26, de 19 de dezembro de 2008. **Estabelece critérios e procedimentos para o ordenamento das operações relacionadas com a pesca do polvo (*Octopus spp.*), nas águas marinhas sob jurisdição brasileira.**

SILVA, L.B. **Desenvolvimento embrionário, descrição e cultivo de paralarvas do polvo comum (*Octopus vulgaris*) da costa sul do Brasil.** Dissertação de Mestrado: Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 101p, 2006.

STUART-SMITH, R.D.; EDGAR, G.J.; BARRETT, N.S.; KININMONTH, S.J.; BATES, A.E. **Thermal biases and vulnerability to warming in the world's marine fauna.** Macmillan Publishers Limited. All rights reserved. Nature. November, 2015.

TEIXEIRA, P.B. **Biologia reprodutiva do polvo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) no sul do Brasil.** Dissertação de Mestrado: Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. 65p, 2011.

TOMÁS, A.R.G.; ÁVILA-DA-SILVA, A.O. **A pesca de polvo com potes nas regiões sudeste e sul do Brasil.** In: Fernandez *et al.* (Eds). Tópicos em Malacologia. Ecos do XIX Encontro Brasileiro de

Malacologia. Sociedade Brasileira de Malacologia. Rio de Janeiro. ISBN: 978-85-61417-01-7. 437-442p, 2011.

TREMBLAY, N.; CAAMAL-MONSREAL, C.; ORTEGA, K.; DÍAZ, F.; CELDRÁN, D.; ROSAS, C. **Measurement of aerobic scope during the whole embryonic development of a cephalopod.** Date Publisher for Earth & Environmental Science. Supplement to: TREMBLAY, N. *et al.* (in review): Measurement of aerobic scope during the whole embryonic development of a cephalopod. Marine Biology. PANGAEA. <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.873863>, 2017. Acesso em: 5 de abril de 2018.

URIARTE, I.; ESPINOZA, V.; HERRERA, M.; ZÚÑIGA, O.; OLIVARES, A.; CARBONELL, P.; PINO, S.; FARÍAS, A.; ROSAS, C. **Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 416-417, 168-175, 2012.

URIARTE, I.; MARTÍNEZ-MONTAÑO, E.; ESPINOZA, V.; ROSAS, C.; HERNÁNDEZ, J.; FARÍAS, A. **Effect of temperature increase on the embryonic development of Patagonian red octopus *Enteroctopus megalocyathus* in controlled culture.** Aquaculture Research. 47, 2582–2593, 2016.

VAZ-PIRES, P.; SEIXAS, P.; BARBOSA, A. **Aquaculture potential of the common Octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review.** Aquaculture. 238, 221-238, 2004.

VIDAL, E.A.G.; FUENTES, L.; SILVA, L.B. 2010. **Definig *Octopus vulgaris* populations: a comparative study of the morphology and chromatophore pattern of paralarvae from Northeastern and Southwestern Atlantic.** Fisheries Research. 106, 199-208, 2010.

VIDAL, E.A.G (Eds). **Advances in marine biology. Advances in cephalopod science: biology, ecology, cultivation and fisheries.** Copyright Elsevier Ltd. ISBN: 978-0-12-800287-2. 479 p, 2014.

VINAGRE, C.; LEAL, I.; MENDONÇA, V.; MADEIRA, D.; NARCISO, L.; DINIZ, M.; FLORES, A.A.V. **Vulnerability to climate warming and acclimation capacity of tropical and temperate coastal organisms.** Ecological Indicators. 62, 317–327, 2016.

YAGI, N.; ARIJI, M.; TAKAHARA, A.; SENDA, Y. **Application of a bioeconomics model to examine sustainability of fishery resources in the global market: the case of octopus resource in Morocco.** The Japanese Society of Fisheries Science. 75, 43-46, 2009.