

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
BIOLÓGICA**

**Ecofisiologia da citrato sintase de corais do Atlântico Sul:
uma abordagem bioquímica comparada**

MARIANA SEMOLA ANGONESE

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Oceanografia Biológica da
Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
como requisito parcial à obtenção do título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Adalto Bianchini

RIO GRANDE

Outubro de 2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA
BIOLÓGICA**

**Ecofisiologia da citrato sintase de corais do Atlântico Sul:
uma abordagem bioquímica comparada**

MARIANA SEMOLA ANGONESE

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Oceanografia Biológica da
Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
como requisito parcial à obtenção do título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Adalto Bianchini

RIO GRANDE

Outubro de 2020

Ficha Catalográfica

A592e Angonese, Mariana Semola.

Ecofisiologia da citrato sintase de corais do Atlântico Sul: uma abordagem bioquímica comparada / Mariana Semola Angonese. – 2020.

77 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Rio Grande/RS, 2020.

Orientador: Dr. Adalto Bianchini.

1. Aquecimento Global e Acidificação 2. Ciclo de Krebs
3. Endemismo 4. Mudanças Climáticas 5. Plasticidade Fisiológica
I. Bianchini, Adalto II. Título.

CDU 551.58

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

*“One individual cannot possibly make a difference, alone.
It is individual efforts, collectively that makes a noticeable
difference – all the difference in the world”*

Dr. Jane Goodall, Coral Restoration Foundation

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Adalto Bianchini por me proporcionar toda a infraestrutura para a realização deste trabalho, e a oportunidade de conhecer diferentes grupos de pesquisa, tal como o Projeto Coral Vivo, além dos meus companheiros cientistas.

Também gostaria de agradecer todo corpo técnico, educadores e colegas do Instituto de Ciências Biológicas e do Instituto de Oceanografia da FURG que contribuíram e me auxiliaram tanto para minha formação pessoal quanto profissional ao longo dos meus dois anos de mestrado. A

toda minha família e meus grandes amigos que me apoiaram por todos esses anos, principalmente Daniela Semola, Alberto Angonese, Camila Bosenbecker, Cassia Martins, Juliana Gaiotto, Mauricio Roza, Maria Fernanda Ramiros, Joseane Marques, Samuel Faria, Aniele Maraschi, entre outros.

Ao meu sábio companheiro de vida, meu amor Victor Blanc que me incentiva todos os dias e me apoia em todas as decisões, com muita paciência, amor e dedicação.

A todos vocês, meu eterno agradecimento.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUÇÃO.....	9
MATERIAL E MÉTODOS	19
Coletas, espécies e manutenção dos organismos.....	19
Exposição à combinação do aumento de temperatura e	
redução da água do mar	20
Avaliação do metabolismo energético aeróbico.....	20
Preparação das amostras.....	20
Atividade enzimática – Citrato Sintase.....	21
Padronização de substratos.....	22
Análises estatísticas	22
SÍNTESE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
APÊNDICE 1	36
Manuscrito submetido ao periódico <i>Coral Reefs</i>.....	36
APÊNDICE 2.....	62
Gráficos de padronização da atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em	
diferentes concentrações dos substratos da enzima (Acetil Coenzima A - ACoA e	
oxaloacetato) para cada uma das espécies	
avaliadas.....	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Relação simplificada entre respiração, fotossíntese e calcificação. Os produtos da respiração de coral são utilizados como substratos na fotossíntese das zooxantelas, e os produtos da fotossíntese são utilizados como substratos na respiração. Adaptado de Nelson and Altieri (2019). **12**
- Figura 2.** Catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos durante os 3 estágios da respiração celular. (Adaptado de Nelson e Cox, 2014) **14**
- Figura 3.** Classificação dos estressores ambientais em relação à demanda energética dos organismos. (a) Representa condições normais com elevado escopo metabólico aeróbico. (b) Representa uma situação de estresse moderado (faixa *pejus*), o organismo aumenta sua demanda energética para manutenção de suas funções vitais, para proteção contra o estresse e para reparação de danos, consequentemente reduzindo seu escopo aeróbico. Já em (c) observamos a faixa de péssimo dos organismos, onde o escopo aeróbico é nulo e uma elevada demanda por ATP para sobrevivência. Adaptado de Sokolova et al. (2012). **17**
- Figura 4.** Mapa da localização do Parque Natural Municipal do Recife de Fora, Bahia, Brasil. Ponto de coleta destacado em vermelho. **19**

RESUMO

Em organismos ectotérmicos o metabolismo aeróbico desempenha papel fundamental no fornecimento de energia para sobrevivência e tolerância frente às alterações climáticas. Nesse sentido, sete espécies de corais escleractíneos e um hidrocoral representativos do Atlântico Sul foram aclimatados e expostos ao tratamento combinado de aumento da temperatura (+2,5°C) e redução do pH (-0.3 unidades) da água do mar por 15 dias. Para avaliar a capacidade aeróbica destes corais diante do cenário futuro, a atividade da citrato sintase (CS) foi avaliada e comparada sob uma perspectiva filogenética entre as espécies, como potencial indicador da capacidade aeróbica dos organismos. A hipótese é de que as espécies dos recifes do Atlântico Sudoeste apresentem aumento na atividade da CS após simulações de alterações climáticas e que os representantes endêmicos demonstrem uma atividade enzimática mais elevada do que aqueles com distribuição anfi-Atlântica. Das espécies estudadas, a maioria não apresentou mudanças na atividade da CS, enquanto que *Porites branneri*, *Mussismilia hispida* e *Millepora alcicornis* demonstraram uma resposta compensatória. Entretanto, a cinética da CS discriminou grupos de espécies com diferentes origens biogeográficas, uma vez que os representantes endêmicos do Atlântico Sudoeste revelaram uma atividade da CS mais elevada do que as espécies de distribuição Atlântica mais ampla, independentemente das suas relações filogenéticas. Sugere-se que a história evolutiva exclusiva das linhagens de corais da costa brasileira contribuiu para o aumento da tolerância das espécies endêmicas às alterações avaliadas. Assim, apesar dos resultados demonstrem que a CS não é um biomarcador energético interessante para avaliar os efeitos das alterações climáticas devido às suas respostas específicas entre as espécies analisadas, pode ser considerada como uma métrica informativa para apontar espécies com diferentes origens biogeográficas. Particularmente para os corais do Atlântico Sul, esta abordagem bioquímica comparativa destaca a maior tolerância das espécies endêmicas em nível subcelular de organização, e deve sustentar a maior tolerância das mesmas frente às futuras mudanças climáticas quando comparadas àquelas dos típicos recifes oligotróficos mundiais.

Palavras-chave: Aquecimento global e acidificação, Ciclo de Krebs, Endemismo, Mudanças climáticas, Plasticidade fisiológica

ANGONESE MSA. Ecophysiology of citrate synthase in South Atlantic corals: a biochemical approach[dissertation]. Rio Grande: Biological Oceanography, University of Rio Grande;2020.

ABSTRACT

In ectothermic organisms, aerobic metabolism plays a key role in providing energy for survival and tolerance to climate change. In this sense, seven species of scleractinian corals and one hydrocoral representatives of the South Western Atlantic were acclimatized and exposed to the combined treatment of temperature increase (+2.5°C) and reduction of pH (-0.3 units) of sea water for 15 days. To evaluate the aerobic capacity of corals in face of the future scenario, the citrate synthase (CS) activity was evaluated and compared from a phylogenetic perspective among species, as a potential indicator of the aerobic capacity of organisms. The hypothesis is that the South Western Atlantic reef species indicate an increase in CS activity after climate change simulations and that the endemic representatives demonstrate a higher enzymatic activity than those with anfi-Atlantic distribution. Most species exhibited no response from CS activity, while *Porites branneri*, *Mussismilia hispida* and *Millepora alcicornis* revealed a compensatory response. However, the CS kinetics discriminated groups of species with different biogeographic origins, since the endemic representatives of the South Western Atlantic revealed a higher CS activity than the species with wider Atlantic distribution, regardless of their phylogenetic relationships. It is suggested that the unique evolutionary history of the Brazilian coast has contributed to the tolerance of endemic species to climate change. Thus, the results of this study demonstrate that CS is not an interesting energetic biomarker to evaluate the effects of climate change, due to its specific responses among the species analyzed, however it may be considered an informative metric to point species with different biogeographic origins. Particularly for South Atlantic corals, this comparative biochemical approach highlights the greater tolerance of endemic species at a subcellular level of organization, and should sustain the greater tolerance of these species to future climate change when compared to those of the world's typical oligotrophic reefs.

Keywords: Climate change, Endemism, Global warming and acidification, Krebs cycle, Physiological plasticity

INTRODUÇÃO

Os recifes de coral são estruturas biológicas maciças que atingem grandes extensões do oceano, inclusive podendo ser vistas do espaço. Essas estruturas são resultantes da interação de diversos organismos calcificadores, mas principalmente das relações simbióticas entre diminutos pólipos de coral (Classe Anthozoa e Ordem Scleractinia) e microalgas unicelulares dinoflageladas pertencentes a Família Symbiodiniaceae (Yellowlees et al. 2008). Além das microalgas, os corais ainda mantêm uma série de associações com uma ampla diversidade de microorganismos, tais como bactérias, vírus e fungos, que auxiliam na adaptabilidade e tolerância à variações ambientais adversas (Morrow et al. 2018). Desta forma, os corais calcificadores também são classificados como meta-organismos (Putnam, 2017) que, em conjunto, e de forma organizada, formam grandes recifes através do acúmulo de deposição de suas estruturas de carbonato de cálcio (CaCO_3).

Os recifes de corais representam ecossistemas extremamente importantes conhecidos como verdadeiros oásis oceânicos, por abrigar em menos de 1% da superfície oceânica abrigando aproximadamente 25% de todas as espécies marinhas (Reaka-Kudla, 1997). Portanto, é considerado um sistema ecológico único e responsável por fornecer grande heterogeneidade de habitats e abrigar relações ecológicas complexas. De forma geral, como linhagem os corais já sobreviveram à diversos eventos de extinção em massa associados às flutuações climáticas de temperatura e concentração de CO_2 atmosféricos e persistem por aproximadamente mais de 400 milhões de anos (Stolarski et al. 2011). O evento mais recente de extinção em massa dos recifes de águas rasas foi durante o período da Máxima Termal do Paleoceno-Eoceno (PEMT) ocorrido cerca de 55,8 Ma (Pandolfi et al. 2011), o qual foi caracterizado por uma conjuntura de rápido aumento da temperatura superficial dos oceanos (SST) e aumento de CO_2 , muito semelhante às projeções atuais.

Porém, os ambientes recifais da Província Brasileira apresentam três características únicas. Uma delas é que, diferentemente de outros ecossistemas recifais tropicais oligotróficos do mundo (i.e. províncias Indo-Pacíficas e Atlântico Norte), os recifes brasileiros apresentam um elevado grau de endemismo (Castro e Pires, 2001) com corais altamente adaptados às condições hidrodinâmicas intensas (Leão et al. 2019), elevada sedimentação terrígena (Winter et al. 2016) e, consequentemente, mais adaptados à maior turbidez da água (Duarte et al. 2020). Portanto, os processos de fotossíntese em ambientes turvos têm a intensidade luminosa como fator limitante e, consequente, menor aquisição de energia através das vias autotróficas (Mies et al. 2020). Nessas condições, a heterotrofia contribui com até 60% da demanda energética do coral (Palardy et al. 2005), via alimentação de matéria orgânica, bactérias e/ou zooplâncton (Houlbrèque e Ferrier-Pagès, 2009).

A segunda característica dos recifes brasileiros está associada ao fato de que estes são construídos por uma baixa diversidade de espécies de corais verdadeiros, sendo dominado por formas arcaicas, remanescentes de uma fauna coralínea ancestral datada do Paleoceno (Leão et al. 2019). Por sua vez, a terceira característica deve-se ao fato de que estes são compostos majoritariamente por morfologias coloniais maciças (Loya et al. 2001), sendo estas mais resilientes aos estresses ambientais, diferentemente de formas ramificadas e incrustantes (Camp et al. 2016). Hennige et al. (2008) afirmam que as morfologias coralíneas maciças são mais tolerantes a eventos de distúrbios ambientais, quando comparados à morfologia de corais não-maciços, acreditando-se que os corais maciços sejam responsáveis por aumentar a resiliência do recife como um todo.

Dentre as 21 espécies de corais verdadeiros, 5 espécies são endêmicas do Brasil, entre elas são as espécies: *Mussismilia hispida*; *Mu. Harttii*; *Siderastrea stellata* e *Favia gravida* (Leão et al. 2003; 2016; 2019). A espécie *Mu. hispida* apresenta uma ampla distribuição ao longo da costa brasileira (Soares et al. 2017). Já dentre as espécies de ampla distribuição no Atlântico, denominadas anfi-atlânticas, também encontradas nos recifes brasileiros destacam-se as espécies: *Porites astreoides*; *Po. branneri* e *Montastraea cavernosa*. Quanto aos seus habitats, *S. stellata* e *F. gravida* são as principais espécies que ocupam as regiões mais rasas e próximas à superfície dos recifes, podendo permanecer semi-expostas durante períodos de baixa maré (Leão

et al. 2016). Sendo assim, essas espécies estão constantemente sujeitas a uma maior variabilidade ambiental como maiores amplitudes de temperatura, intensa radiação solar e salinidade, sendo assim consideradas mais resistentes (Costa et al. 2008, Soares et al. 2017, Leão et al. 2019). Em regiões mesofóticas, entre 25 e 90 m de profundidade, *M. cavernosa* é dominante com morfologia achatada e/ou incrustante (Soares et al. 2017), também podendo haver ocorrência esparsa dos gêneros *Porites* e *Favia* (Leão et al. 2016).

O hidrocoral *Millepora alcicornis* possui distribuição cosmopolita e é encontrado nas regiões a barlavento e nas bordas dos recifes (Leão et al. 2019). Apesar de não ser um coral-pétreo verdadeiro, apresenta grande relevância ecológica nos recifes brasileiros, sendo o segundo maior formador de recifes de corais no Brasil, depois de *Mu. harttii* (Lewis, 2006). Também conhecido como coral-de-fogo, esse hidrocoral apresenta morfologia que gera complexidade e heterogeneidade na estrutura de habitats (Coni et al. 2013), uma vez que são os únicos corais que apresentam ramificações dentro do ecossistema recifal brasileiro (Oliveira et al. 2019). Como consequência, eles provêm um maior número de nichos para espécies de vertebrados e invertebrados que habitam os recifes coralíneos (Nogueira et al. 2015; Denis et al. 2017).

A complexidade inerente de sistemas de alta diversidade como os recifes de corais os torna particularmente difícil de serem estudados (Belwood et al. 2019). A aquisição de energia é peculiarmente interessante nos corais zooxantelados, uma vez que estes são considerados animais politróficos, obtendo energia por duas vias distintas: (i) através da autotrofia dos endossimbiontes, onde os produtos orgânicos da fotossíntese, principalmente glicose e glicerol (Marangoni et al. 2016), são transferidos para o coral hospedeiro; e (ii) heterotroficamente, onde os corais captam ativamente seus alimentos, compostos principalmente de zooplâncton (Mies et al. 2018). Contudo, independentemente da via de aquisição de energia, os corais precisam promover a degradação destas biomoléculas complexas, principalmente a glicose, em produtos simplificados com liberação de energia, através do processo conhecido como respiração celular (Nelson e Cox, 2014).

Ainda no contexto metabólico descrito acima, deve-se ressaltar o processo de biomineralização/calcificação dos corais, o qual é metabolicamente custoso, recrutando até 30% da energia metabólica dos corais (Bertucci, 2013). A calcificação é um processo fisiológico realizado por cada pólipo de coral, ao depositar esqueleto de CaCO_3 . O esqueleto de CaCO_3 é composto por uma fração orgânica incorporada na estrutura CaCO_3 , na forma mineral de aragonita (Tambutté et al. 2011). Para suprir a alta demanda de CO_2 , tanto para a fotossíntese quanto para a calcificação, os corais utilizam fontes de carbono inorgânico de origem metabólica (CO_2) ou através da captura de íons carbonato (HCO_3^-) do meio externo. Em condições normais, a alta demanda de carbono inorgânico é suprida através da fotossíntese (Allemand et al. 2004), que é responsável por fornecer ao coral hospedeiro a maior parte dos seus requerimentos energéticos (Yellowlees, 2008). Nesse sentido, a simbiose coral-zooxantela possibilita uma maior fixação de CO_2 , a qual acelera os processos de calcificação (VanOppen et al. 2015). Essa relação está apresentada de forma simplificada na figura 1.

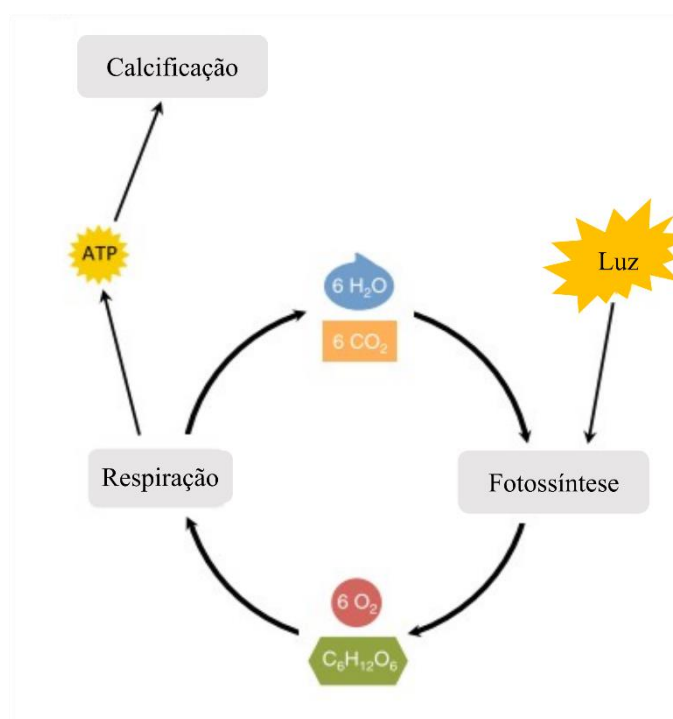


Figura 1. Relação simplificada entre respiração, fotossíntese e calcificação. Os produtos da respiração de coral são utilizados como substratos na fotossíntese das zooxantelas, e os produtos da fotossíntese são utilizados como substratos na respiração. Adaptado de Nelson & Altieri (2019).

No caso dos corais, o catabolismo ocorre principalmente através da degradação das biomoléculas de glicerol e glicose advindas da fotossíntese das zooxantelas (Marangoni et al. 2016). O primeiro estágio do metabolismo de glicose é chamado de glicólise. Este é um processo anaeróbico que produz moléculas de ATP e piruvato. Por sua vez, o piruvato proveniente da glicólise pode ter diferentes destinos no metabolismo, os quais dependem da disponibilidade de oxigênio e da demanda energética do coral. Na presença de oxigênio, a respiração é aeróbica e ocorre na mitocôndria das células.

Cada molécula de piruvato produzida pela glicólise é convertida em acetil-coenzima A (ACoA), com formação de NADH e dióxido de carbono (CO_2). A citrato sintase (CS) é a enzima responsável por realizar a primeira reação do ciclo de Krebs, também conhecido como ciclo do ácido cítrico, formando citrato, a partir do oxaloacetato e ACoA. Esta etapa é conhecida como Condensação de Claisen, sendo a CS a única enzima no ciclo que pode catalisar a formação de uma ligação carbono-carbono (Wiegand e Ramington, 1986). Depois de um ciclo completo, o citrato é reduzido novamente a oxaloacetato, formando as coenzimas reduzidas NADH e flavina adenina dinucleotídeo reduzido (FADH_2), além de CO_2 e ATP (Figura 2).

Posteriormente, ocorre a oxidação das coenzimas reduzidas (NADH e FADH_2), as quais são formadas na glicólise e no ciclo de Krebs pelos complexos da cadeia transportadora de elétrons presente na membrana interna da mitocôndria. No final da cadeia transportadora ocorre a redução de um aceptor final de elétrons, a molécula de oxigênio (O_2), a qual é reduzida a água (H_2O). No ciclo de Krebs, cada molécula de piruvato produz uma molécula de CO_2 , três moléculas de NADH e uma molécula de FADH_2 . Para cada molécula de glicose oxidada, podem ser formadas 32 moléculas de ATP (Nelson e Cox, 2014).

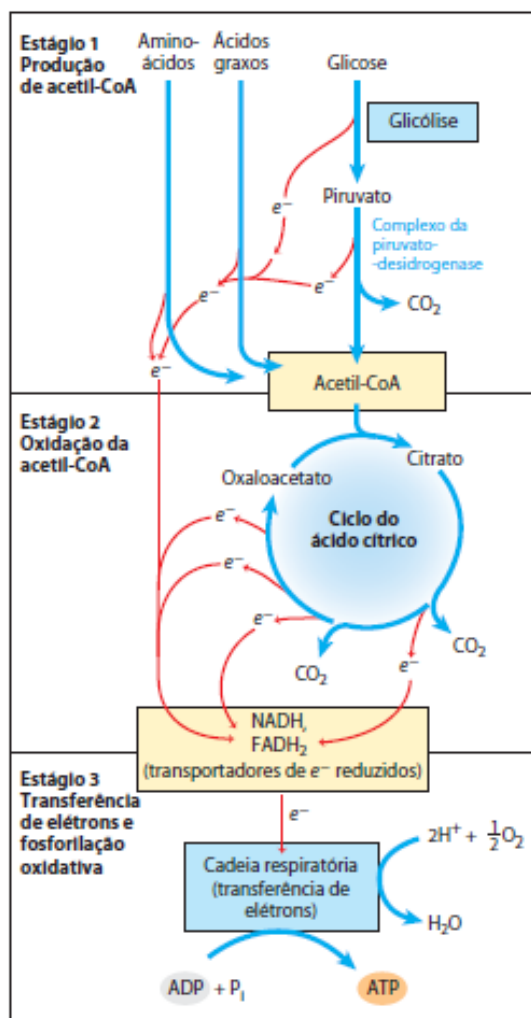


Figura 2. Catabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos durante a respiração celular. (Adaptado de Nelson e Cox, 2014).

A CS está presente em quase todas as células vivas, desempenhando papel fundamental na via metabólica dos organismos aeróbicos (Hawkings et al. 2016). Vetter (1994) afirma que a quantidade de CS em cada célula reflete a capacidade oxidativa da mesma. Ainda, por ser considerada uma enzima marca-passo (Nelson e Cox, 2014), a CS é regulada pela concentração de ATP (Hathaway e Atkinson, 1965), e dessa forma, ela controla a velocidade de todas as reações do ciclo de Krebs. Em células eucarióticas, a CS consiste em duas subunidades idênticas e ocorre quase exclusivamente nas mitocôndrias. Não obstante, essa enzima é altamente específica em relação aos seus substratos e reage apenas com o oxaloacetato e a ACoA, onde

cada subunidade possui um local com sítio de ligação ativo para cada um destes substratos (Wiegand e Ramington, 1986). Assim, qualquer variação na concentração de oxaloacetato ou ACoA pode desencadear alterações na atividade da CS (Srere, 1971).

De um modo geral, a atividade enzimática está envolvida em todos os níveis do metabolismo e, portanto, alterações nos parâmetros cinéticos enzimáticos ou na regulação da síntese enzimática estão envolvidos na adaptação e aclimação dos organismos (Morley et al. 2009), sendo a temperatura um dos principais fatores abióticos que afetam a atividade e a regulação metabólica (Hochachka e Somero, 2002). Dada sua importância na respiração aeróbica em eucariotos, a atividade da CS pode ser utilizada como um previsor da capacidade aeróbica máxima dos organismos (Vetter, 1994), como já demonstrado para invertebrados marinhos como moluscos bivalves (Dahlhoff et al. 2002; Collins et al. 2020; Pace et al. 2006); crustáceos (Atlante et al. 2016; Klymasz-Swartz et al. 2019); anelídeos (Curd et al. 2019); e anêmonas (Hawkins et al. 2016).

No caso dos corais, Gattuso et al. (1993) avaliaram a atividade da CS no coral *Stylophora pistillata* em um gradiente de distribuição vertical onde demonstraram uma diminuição da atividade da CS com o aumento de profundidade refletindo uma modulação negativa de ATP. Henry et al. (2013) avaliaram diversas enzimas do metabolismo energético do coral solitário *Flabellum impensum*, distribuído na Antártica, e encontraram o valor de 0.126 ± 0.029 (unidades $\text{g}^{-1} \pm$ erro padrão) da atividade da CS. Já Rivest e Hofmann (2014) avaliaram a atividade da CS em larvas de *Pocillopora damicornis* em tratamento combinado de aumento de temperatura e diminuição do pH e afirmaram uma diminuição da capacidade oxidativa para o futuro cenário de aquecimento e acidificação marinhos. Já para espécies de coral brasileiras, o primeiro trabalho foi realizado por Fonseca et al. (2019), no qual a atividade da CS foi avaliada em experimento combinado de exposição ao cobre e aumento de temperatura no coral cérebro endêmico *Mussismilia harttii*, onde os efeitos dos estressores (combinados e isolados) induzem um estado de limitação do metabolismo energético aeróbico.

Entretanto, com base no acúmulo de CO₂ na atmosfera causado pela queima de combustíveis fósseis e o desmatamento, é previsto um aumento de 2,5°C na temperatura oceânica e uma redução de pH em 3 unidades até o ano de 2100 (IPCC, 2014). Hughes et al. (2018) afirmam que os recifes de corais estão entre os ecossistemas mais ameaçados pelas mudanças climáticas globais, onde o aquecimento e acidificação dos oceanos ameaçam as estruturas e funções desses ecossistemas recifais, afetando consequentemente, seus imensos recursos econômicos, biológicos, físicos e culturais (Woodhead et al. 2019).

Nesse contexto, a redução do pH aumenta a solubilidade dos elementos que compõe os esqueletos calcários, promovendo a reação entre H⁺ e CO₃²⁻, reduzindo assim a concentração de carbonato e, consequentemente, diminuindo o estado de saturação da aragonita (Fabricius et al. 2011). Portanto, a manutenção de um elevado estado de saturação da aragonita no fluido de calcificação aumenta ainda mais o custo energético da biomineralização (Cohen et al. 2009).

Em relação ao aumento de temperatura, vale lembrar que os corais são animais ectotérmicos, ou seja, são adaptados e dependem da manutenção de faixas de temperatura ótima características de seus ambientes naturais (Pörtner et al. 2001). Sabe-se que a temperatura é um componente ambiental dominante que afeta todos os organismos vivos, alterando a energia cinética das biomoléculas, suas taxas de colisão e reação, a força das interações moleculares e outras propriedades físico-químicas (Elias et al. 2014). Pörtner et al. (2001) afirmam que quando o organismo está fora da sua faixa ótima de temperatura, seu escopo metabólico aeróbico diminui ou desaparece. Desta forma, o coral deve realizar ajustes na sua densidade mitocondrial e/ou alterações nas reações metabólicas, visando manter o alcance aeróbico positivo (Hochachka e Somero, 2002).

Nesse sentido, Sokolova et al. (2012, 2013) afirmam que a habilidade de sustentar o metabolismo energético aeróbico é fundamental para classificar os níveis de estresse ambiental entre moderado e/ou extremo. No contexto do metabolismo aeróbico, essa classificação se aplica entre as faixas de ótimo e *pejus* (do latim pior). Na faixa do ótimo, o balanço energético é positivo, onde a atividade aeróbica é máxima e está disponível para atividade, crescimento, desenvolvimento, reprodução e reserva

energética. Enquanto na faixa de *pejus*, o balanço aeróbico ainda é positivo, porém reduzido quando comparado à faixa do ótimo. A redução ocorre devido ao aumento da taxa metabólica basal e/ou prejuízos da capacidade aeróbica (Figura 3). Essa classificação dos estresses ambientais baseada no metabolismo permite comparar os efeitos de diversos estressores e focar nos efeitos fisiológicos que estão conectados ao *fitness* dos organismos e que, consequentemente, podem ser traduzidos em alterações no nível de população (Sokolova et al. 2013).

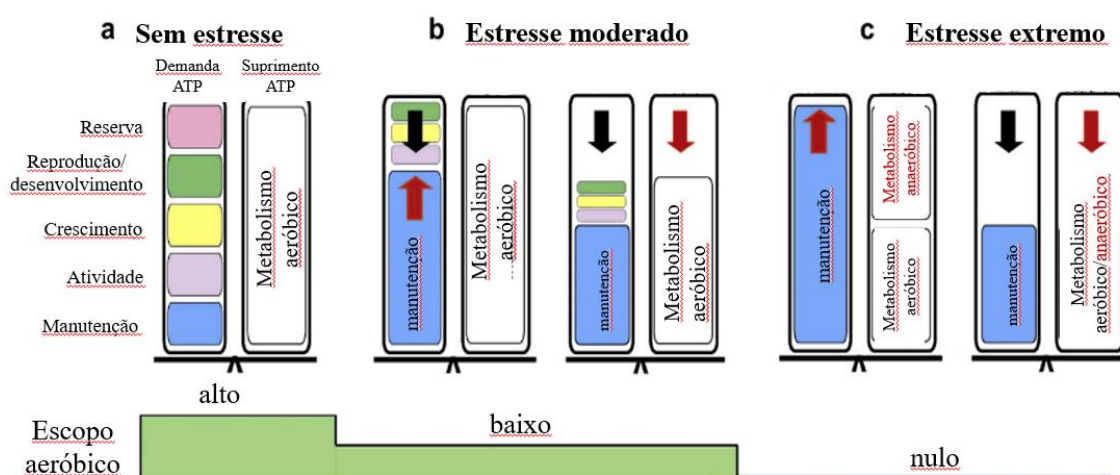


Figura 3. Classificação dos estressores ambientais em relação à demanda energética dos organismos. (a) Representa condições normais com elevado escopo metabólico aeróbico. (b) Representa uma situação de estresse moderado (faixa *pejus*), onde o organismo aumenta sua demanda energética para manutenção de suas funções vitais, proteção contra o estresse e reparação de danos, consequentemente reduzindo seu escopo aeróbico. Já em (c) observa-se a faixa de péssimo dos organismos, onde o escopo aeróbico é nulo e ocorre uma demanda elevada de ATP para sobrevivência. Adaptado de Sokolova et al. (2012).

Pörtner et al. (2017) afirmam que a plasticidade fenotípica dos organismos difere entre indivíduos de uma mesma espécie e/ou entre populações de uma mesma espécie, gerando, consequentemente, aclimatação ou adaptação das gerações futuras. Desta forma, é possível que essa adaptação tenha desempenhado um papel central na história

evolutiva dos organismos (Pörtner e Gutt, 2016). Contudo, os efeitos do aquecimento e da acidificação da água do mar variam entre espécies de corais de uma forma ainda não compreendida, sem um padrão interespecífico esclarecido e podem estar associados tanto à história evolutiva das linhagens quanto à natureza físico-química do Oceano Atlântico Sul. Desta forma, se torna importante ressaltar que o presente estudo descreve, pela primeira vez, uma análise comparativa da atividade da CS entre sete espécies de corais e uma espécie de hidrocoral representativos desta região. É importante ressaltar também que essa enzima não havia sido avaliada em adultos expostos a um experimento combinado que mimetiza o futuro cenário de acidificação marinha e aumento de temperatura.

Considerando a carência de estudos sobre o metabolismo aeróbico da fauna brasileira e suas características diferenciadas expostas acima, o presente estudo avaliou os efeitos das mudanças climáticas no metabolismo energético aeróbico da fauna coralínea brasileira, refletidas pela alteração na atividade da enzima CS. Nesse sentido, também é importante mencionar que apenas uma abordagem organísmica não reflete a complexidade funcional que surge com múltiplas espécies atuando em conjunto no ambiente natural, e que a resposta da comunidade recifal como um todo é mais do que a soma das partes em relação às respostas fisiológicas (Doo et al. 2019). Além disso, uma abordagem ecofisiológica comparativa pode auxiliar na identificação de quais espécies apresentam maior resiliência e/ou susceptibilidade ao cenário futuro de mudanças climáticas, podendo esta ser explicada quanto à origem de distribuição das espécies.

Diante do exposto acima, em um cenário futuro de aumento de temperatura e acidificação dos oceanos, pretende-se avaliar as seguintes hipóteses: (i) o efeito combinado da redução de pH e aumento da temperatura da água do mar causará um aumento do metabolismo dos corais em comparação com o tratamento controle (condições ambientais atuais), sendo este representado por um aumento da atividade da CS; e (ii) dentre as espécies avaliadas, as espécies endêmicas brasileiras *Mu. hispida*, *Mu. harttii*, *S. stellata* e *F. grvida* manterão um melhor desempenho metabólico frente ao cenário combinado da redução de pH e aumento da temperatura da água do mar, uma vez que habitem ambientes naturalmente estressantes quando comparadas às espécies de origem de distribuição anfi-Atlântica: *Po. branneri*; *Po. astreoides*; *M. cavernosa* e o hidrocoral *M. alcicornis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas, espécies e manutenção dos organismos

As colônias das espécies coletadas representativas do Atlântico Sul foram: *Favia grvida*; *Montastraea cavernosa*; *Porites astreoides*; *Porites branneri*; *Siderastrea stellata*; *Millepora alcicornis*; *Mussismilia harttii* e *Mussismilia hispida*. As colônias foram coletadas através de mergulho autônomo, entre 2 e 5 m de profundidade, com distância de aproximadamente 200 m entre as colônias. A coleta foi realizada na Unidade de Conservação do Parque Natural Municipal do Recife de Fora, localizada a 8 km de Porto Seguro, Bahia, Brasil (16° 24' 47" S, 38° 59' 16" W - Figura 4). As coletas foram realizadas no final da primavera do ano de 2017.

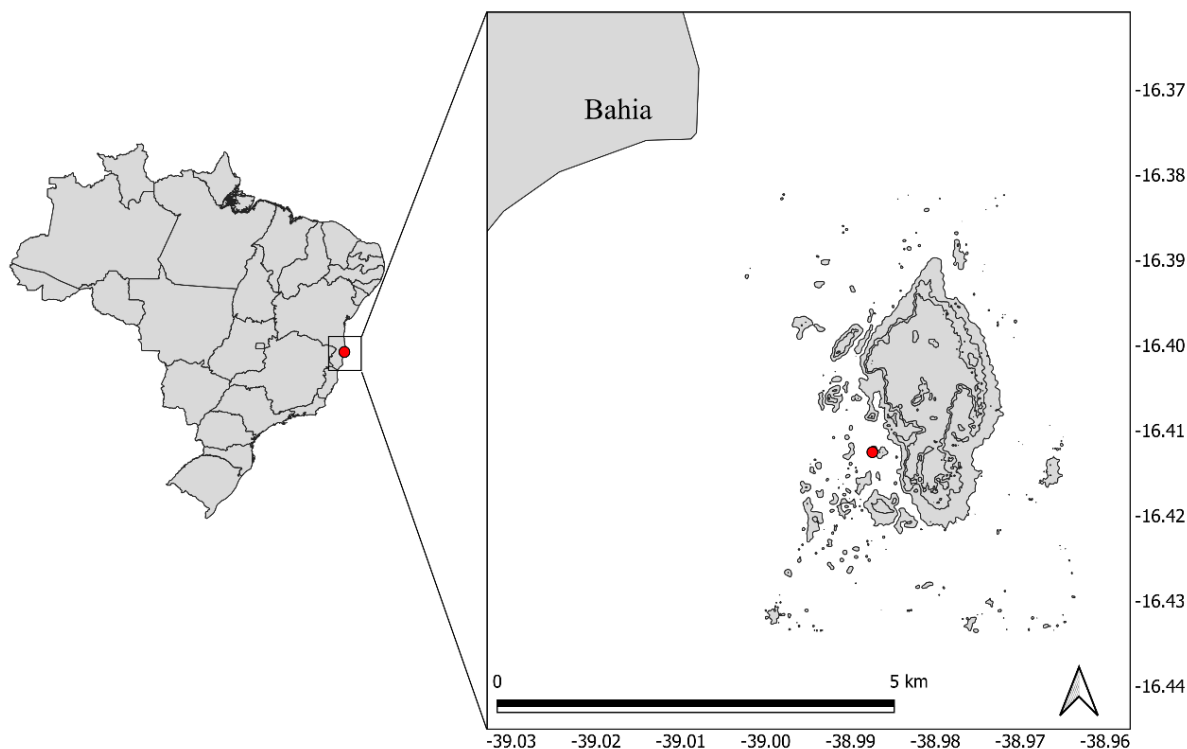


Figura 4. Mapa da localização do Parque Natural Municipal do Recife de Fora, Porto Seguro/Bahia, Brasil. O ponto de coleta encontra-se destacado em vermelho.

Na base laboratorial do Projeto Coral Vivo em Arraial d'Ajuda (Porto Seguro, BA), fragmentos/colônias de cada espécie ($N = 12$) foram individualmente fixados em placas acrílicas e aclimatados em aquários por 21 dias, antes do experimento. Foram utilizadas duas baterias de aquários, cada uma com 3 aquários de 80 L conectados em série, com circulação intra-aquários (SarloBetter 500 L/h) e interaquários (SarloBetter 2.000 L/h). Cada bateria foi conectada ao seu respectivo reservatório, obtendo-se, desta forma, a água com o pH e a temperatura desejados. O fluxo de cada bateria experimental foi de 38 L/h, sendo a água circulante proveniente de uma cisterna (5.000 L), a qual era preenchida duas vezes ao dia (10h00min e 22h00min) com água do mar oriunda de uma franja recifal localizada nas proximidades da base laboratorial, a fim de manter todas as características físico-químicas do ambiente natural, tais como disponibilidade de matéria orgânica, salinidade e turbidez (Duarte et al. 2015), com exceção da temperatura (26 ± 0.1 °C) e do pH (8.1 ± 0.05), os quais foram controlados experimentalmente. No momento da coleta a temperatura, pH, salinidade e luminosidade foram 26.3 ± 0.2 °C, 8.11 ± 0.02 ,

38.4 ± 0.1 ‰ S, e 105 ± 21 PAR, respectivamente, utilizando-se um medidor multiparâmetro portátil (Sanxin SX751).

Exposição à combinação do aumento de temperatura e redução do pH da água do mar

Após o período de aclimação (21 dias), fragmentos ($N = 4$) de cada espécie foram transferidos para a bateria de aquários contendo água do mar em condições controladas. Os corais foram expostos ao tratamento combinado de aumento da temperatura ($+2.5^{\circ}\text{C}$) e redução do pH da água do mar (-0.3 unidades de pH), por 15 dias. A temperatura e o pH da água do mar foram controlados (26 ± 0.1 °C e 8.1 ± 0.05) através de resistências/reatores de dióxido de carbono, ambos monitorizados digitalmente e continuamente (Full Gauge MT 512E 2HP e Ista Aquarium Digital pH, respectivamente), visando manter as condições de um futuro cenário de mudanças climáticas globais contemplado pelo IPCC (2014) para até 2100. O nível de luz foi mantido constante em 110 PAR (LI-COR, LI 250A Light Meter, LI-193 Underwater Spherical Quantum Sensor) sob fotoperíodo de 12h claro/ 12h escuro.

No final do tempo experimental, as amostras de coral foram imediatamente armazenadas em -80°C e enviadas para a Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para análise da atividade enzimática.

Avaliação do metabolismo energético aeróbico

Preparo das amostras

O tampão de preparação das amostras para a análise enzimática dos holobiontes foi realizado conforme descrito por Fonseca et al. (2019). Cada alíquota de amostra ($\sim 0.5\text{g}$) foi homogeneizada por ultrassom (Q Sonic, CL-188) com 150 μl de tampão de homogeneização gelado (50 μl de Imidazol 50m M e 1 μl de fenilmetilsulfonilfluoreto - PMSF para cada ml de solução de Imidazol). Após sonicadas, as amostras foram centrifugadas ($10.000 \times g$), a 4°C , por 20 min (Sigma 3K30). O sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte enzimática.

Atividade da Citrato Sintase (CS)

A atividade da CS foi analisada de acordo com os protocolos descritos por Lallier e Walsh (1991) e modificado por Lauer et al. (2012). O ensaio para determinação da atividade desta enzima consiste na reação do grupo tiol do CoA-SH com DTNB, formando TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico), o qual é determinado espectrofotometricamente (absorbância em 412 nm). O volume final da solução de reação em cada poço da microplaca foi composto por 270 µl de HEPES (50 mM), 15 µl de ACoA (concentrações descritas abaixo) e 10 µl de DTNB (3,5 mM). Em cada poço da microplaca foram pipetados 295 µl da solução de reação e 5 µl da amostra previamente homogeneizada. Por fim, foram adicionados 50 µl de oxaloacetato em cada poço para dar início à reação. Portanto, o volume final da solução de reação foi de 350 µl.

Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância da amostra a cada 30 s, durante 5 min, perfazendo um total de 11 leituras, utilizando-se uma leitora de microplacas (ELx808IU, 338 BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). A atividade enzimática foi medida através da variação da absorbância (412 nm) da amostra, associada à redução do ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). Todas as leituras de absorbância foram realizadas na temperatura fixa de 25°C.

A atividade enzimática relativa foi calculada de acordo com a equação descrita abaixo.

$$\text{Atividade Relativa(\%)} = \frac{\alpha \times V}{\epsilon \times L \times \text{vol}}$$

Onde α é a inclinação da reta, V é o volume da solução de reação (350 µl), ϵ é o coeficiente de extinção (13,6 para DTNB, em 412 nm), L é o caminho óptico percorrido (1 cm para microplaca de 96 poços e volume de 350 µl) e vol é o volume de amostra utilizada (5 µl).

Para calcular a atividade enzimática final, a atividade relativa foi normalizada pela concentração de proteínas presentes na amostra. Cada amostra foi previamente centrifugada (13.000 xg) a 4°C, e a quantificação da concentração de proteínas foi

realizada com 2 µl de amostra, utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis Biodrop µLite. O resultado da atividade enzimática foi expresso em unidades enzimáticas (U) por miligrama de proteínas (U mg⁻¹ proteínas).

Padronização dos substratos

Visando evitar um efeito do substrato nas comparações interespecíficas, as concentrações ótimas de cada substrato (ACoA e oxaloacetato) para a atividade da CS foram padronizadas para cada espécie, avaliando a cinética da reação de condensação através de condições de estado estacionário, ou seja, da relação linear entre a formação do produto e o tempo (Segel, 1975). Um conjunto de fragmentos de todas as réplicas foi amostrado tanto para amostras do grupo controle como para amostras do grupo tratamento (N = 4, para cada condição experimental). A atividade da CS foi avaliada através da variação da concentração de ACoA, utilizando-se seis diferentes concentrações do substrato (0,1; 0,5; 1,0; 1,3; 2,3 e 3,3 mM). Por sua vez, a concentração de oxaloacetato foi fixada em 3,5 mM. Uma vez encontrada a atividade ótima em função da concentração de ACoA para cada espécie, a respectiva concentração de ACoA foi então fixada, e novamente a atividade da CS foi avaliada através da variação da concentração do oxaloacetato (1,5; 2,5; 3,5; 4,5 e 5,5 mM). As concentrações ótimas de ACoA e de oxaloacetato definidas para cada espécie, nas duas condições experimentais (controle e tratamento), estão apresentadas na Tabela 1 (Apêndice 1). Por sua vez, os gráficos das curvas de padronização encontram-se no Apêndice 2.

Tratamentos estatísticos

O efeito combinado do tratamento de aumento da temperatura e da redução do pH da água do mar na atividade enzimática de cada espécie foi avaliado através da Análise de Variância (ANOVA) de uma via.

Para avaliações interespecíficas, uma vez que a correlação entre a divergência fisiológica e o tempo evolutivo torna "espécies" como unidades estatísticas dependentes (Felsenstein, 1985), foi assumida a árvore filogenética de Kitahara et al. (2016), visando manter apenas as espécies avaliadas bioquimicamente no presente estudo, e então realizar, de forma adequada, comparações entre estas espécies

(Rezende e Diniz-Filho, 2012). *Millepora alcicornis* foi artificialmente utilizada como *outgroup*, e o comprimento dos ramos foi transformado posteriormente, de acordo com Grafen (1989).

Para testar se espécies de corais estreitamente relacionadas tendem a mostrar atividades de CS semelhantes às escolhidas aleatoriamente da árvore (i.e. sinal filogenético), foi aplicado o parâmetro K de Blomberg (Blomberg et al. 2003). A hipótese de que as alterações climáticas simuladas promovem um efeito compensatório na atividade da CS foi avaliada através do teste t filogenético pareado (Lindénfors et al. 2010). Por sua vez, o efeito da origem da espécie (endêmico x anfi-Atlântico) sobre a atividade enzimática foi avaliado através do modelo filogenético generalizado dos mínimos quadrados (pGLS), empregando-se simultaneamente o parâmetro α ou a força de restrição (Revell, 2010).

Todas as análises foram realizadas utilizando-se a plataforma *R* (versão 4.0.0), assumindo um nível mínimo de significância de 95% ($\alpha = 0,05$). Os pacotes utilizados foram *phytools* (Revell, 2012), *ape* (Paradis et al. 2005) e *nlme* (Pinheiro et al. 2015). Os dados foram matematicamente transformados, usando a função logarítmica, visando atender aos pressupostos de normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade das variâncias (teste de Bartlett). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

SÍNTESE DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o cenário simulado de aquecimento e acidificação marinha testado no presente estudo, observou-se que a maioria dos holobiontes avaliados não foi responsiva em relação à atividade da CS. Nesse sentido, devemos considerar o curto tempo de aclimação (21 dias) e posterior exposição (15) que podem não terem sido suficientes para respostas significativas da atividade enzimática.

Contudo, a cinética da CS discriminou grupos de espécies de corais com diferentes origens de distribuição, uma vez que os representantes endêmicos dos recifes do Atlântico Sudoeste (South Western Atlantic – SWA, Figura 2; Apêndice 1) revelaram uma maior atividade da CS quando comparados aos corais com distribuição

Atlântica mais ampla, independentemente das suas relações filogenéticas. Devido à plasticidade cinética da CS, considerando-se a filogenia dos corais, sugere-se que a história evolutiva exclusiva na costa brasileira contribui para a tolerância das espécies de corais frente às alterações climáticas (Mies et al. 2020).

As maiores médias de atividade da CS foram observadas na condição controle para as espécies endêmicas *Siderastrea stellata* e *Favia gravida* (0.07 ± 0.01 e 0.06 ± 0.01 U mg⁻¹, respectivamente). Por sua vez, as menores médias foram encontradas para as espécies de origem anfi-Atlântica *Porites branneri* e *Millepora alcicornis* (0.002 ± 0.001 e 0.001 ± 0.000 U mg⁻¹, respectivamente) (Figura 2, Apêndice 1).

Interessantemente, as mesmas espécies de origem anfi-Atlântica (*P. branneri* e *M. alcicornis*) foram as que apresentaram um aumento significativo (ANOVA, $39.1 \leq F \leq 152.4$, $P < 0.001$) na atividade da CS após a exposição ao tratamento de aumento de temperatura (+2.5°C) e acidificação da água do mar (-0.3 unidades de pH). Dentre todas as espécies endêmicas avaliadas, apenas o coral *Mu. hispida* demonstrou aumento significativo da atividade enzimática ($F = 21.7$, $p = 0.003$) (Figura 2, Tabela 2, Apêndice 1).

O aumento na atividade da CS descrito acima pode ser interpretado como sendo um efeito compensatório (Storey e Brooks, 1995), para contrabalancear os efeitos causados pelas mudanças climáticas no metabolismo energético dos corais. Provavelmente, o efeito combinado do aumento de temperatura e da redução de pH da água do mar aumentaram a atividade da CS nessas espécies devido à um aumento do metabolismo sistêmico em geral, uma vez que já foi demonstrado que os organismos precisam realocar suas fontes energéticas para manter a homeostase, a fim de lidar com estressores ambientais (Sokolova et al. 2012; 2013). Sabe-se que a temperatura e o pH são considerados variáveis centrais para o funcionamento enzimático (Hochachka e Somero, 2002). A temperatura é um dos principais fatores abióticos que afetam o metabolismo, desde o nível subcelular até o sistêmico, uma vez que conduz ao estado de saturação das membranas biológicas, cinética das moléculas (Elias et al. 2014) e aumento da demanda de O₂ tecidual nos animais ectotérmicos (Pörtner et al. 2001). Particularmente para os corais, uma redução do pH da água do mar pode alterar o equilíbrio ácido-básico do sítio de calcificação (Allemand et al. 2004) e,

consequentemente, aumentar ainda mais o custo energético do processo de calcificação (Cohen et al. 2009).

Fisiologicamente, o aumento da atividade da CS reflete o aumento da reação de condensação de Claisen entre os substratos ACoA e oxaloacetato para formar mais citrato e, consequente, oxidação completa do substrato inorgânico, formando mais CO₂ e cofatores reduzidos (NADH e FADH₂), com a produção de mais moléculas de ATP (Nelson e Cox, 2014). Numa concepção comparativa, não houve efeito significativo da exposição ao aumento de temperatura e acidificação da água do mar na atividade da CS (teste-*t* pareado filogenético, $t = -0.18$, $df = 5$, $p = 0.87$). Também não foi observado um sinal filogenético significativo da atividade da CS para ambas as condições experimentais (controle e tratamento; $K = \sim 1.0$, $p \geq 0.26$). Isto pode significar que espécies filogeneticamente próximas não compartilham a mesma cinética da CS. Este resultado pode ser observado nos maiores valores de atividade da CS nas espécies *F. gravida* e *S. stellata*. Apesar de serem endêmicas, elas pertencem a clados diferentes, elucidando a homoplasia (*i.e.* evolução independente) de aumento da atividade enzimática (Figura 3, Apêndice 1).

A falta de sinal filogenético também corrobora a diferença estatística observada entre as origens de distribuição das espécies (endêmicas e anfi-Atlânticas), que responderam diferentemente tanto na condição controle quanto no tratamento de exposição ao aumento de temperatura e acidificação da água do mar (PGLS, $4.0 \leq F \leq 10.2$, $p \leq 0.02$, $\alpha = \sim 3.6$). As espécies endêmicas apresentaram um aumento de ~ 3 vezes maior na atividade enzimática quando comparadas àqueles observados nas espécies anfi-Atlânticas (Figuras 2 e 3, Apêndice 1). Nesse sentido, o aumento da CS observado nas espécies endêmicas brasileiras pode ter sido dirigido pela natureza físico-química do Oceano Atlântico Sudoeste, gerando uma evolução exclusiva dessas espécies e que possa ter colaborado para uma maior tolerância aos efeitos das mudanças climáticas, possivelmente através de uma maior capacidade aeróbica. Entretanto, devemos considerar que a atividade da CS foi avaliada e comparada do holobionte das espécies, e que parte desta resposta filogenética possa estar associada à uma mistura de respostas das espécies de corais e seus simbiontes.

Uma vez que a demanda energética esteja relacionada com o metabolismo aeróbico dos corais (Fonseca et al. 2019), maiores atividades enzimáticas devem ser supridas através de maiores níveis de heterotrofia (Grotolli et al. 2006; Rodrigues et al. 2007), o que se torna essencial para a sobrevivência e recuperação em longo prazo (Houlbrèque e Ferrier-Pagès, 2009; Hughes and Grotolli, 2013). Os elevados níveis de sedimentação, turbidez, nutrientes e limites batimétricos mais profundos (até 70 m) do Oceano Atlântico Sudoeste (Winter et al. 2016; Tedesco et al. 2017; Duarte et al. 2020, Mies et al. 2020) provavelmente moldaram uma evolução heterotrófica única para os corais endêmicos brasileiros. De fato, já foi demonstrado que o gênero endêmico *Mussismilia* spp. apresenta elevados níveis de heterotrofia (Mies et al. 2018; Marangoni et al. 2019). Além disso, a morfologia maciça dos corais endêmicos brasileiros confere maiores reservas energéticas (Loya et al. 2001; Rodrigues et al. 2007), contribuindo ainda mais para o aumento da atividade da CS.

No contexto descrito acima, é importante destacar a relevância ecológica das três espécies responsivas ao tratamento de exposição ao aumento de temperatura e acidificação da água do mar. Em 2019, foi registrada uma mortalidade em massa dd corais do Oceano Atlântico Sudoeste, devido às maiores temperaturas da superfície do mar já registradas desde a última década (Duarte et al. 2020). O coral de fogo *M. alcornis*, o segundo maior construtor de recifes no Oceano Atlântico Sudoeste e o único que apresenta uma morfologia ramificada, contribuindo assim significativamente para a complexidade dos recifes (Leão et al. 2010), apresentou as maiores taxas de mortalidade (~80%) durante o evento mencionado acima (Duarte et al. 2020). Por outro lado, a espécie endêmica *Mu. hispida* apresentou baixa taxa mortalidade (~2%) para o mesmo período, onde a elevada capacidade heterotrófica dessa espécie possa ser uma dos fatores para sua baixa mortalidade (Banha et al. 2019; Marangoni et al. 2019; Mies et al. 2018). Além disso, com os dados atuais, e assumindo a atividade da CS como um *proxy* do metabolismo aeróbico, compreende-se tal tolerância do coral cérebro como sendo uma possível consequência de uma também elevada capacidade aeróbica. Apesar de não haver dados disponíveis sobre branqueamento ou mortalidade para *Po. branneri*, este coral é classificado como sendo uma espécie quase ameaçada de extinção, de acordo com *Red List* da IUCN (Aronson et al. 2008) e, portanto, merece uma devida atenção à sua conservação.

CONCLUSÕES

O presente estudo é o primeiro a avaliar a atividade enzimática de corais/hidrocorais sob uma perspectiva filogenética. A partir dos resultados obtidos, foi demonstrado que a atividade da CS não é um biomarcador energético interessante para avaliar os efeitos das alterações climáticas, devido à sua resposta em função das espécies, mas configura-se como uma métrica informativa para discriminar espécies com diferentes origens biogeográficas, corroborando a segunda hipótese deste trabalho. Particularmente para os recifes do Oceano Atlântico Sudoeste, a abordagem bioquímica comparativa aplicada no presente estudo destaca a maior tolerância das espécies endêmicas brasileiras em um nível subcelular de organização, o que deve sustentar os níveis mais reduzidos de branqueamento observados nestas espécies quando comparados àqueles observados nos típicos recifes oligotróficos ao redor do mundo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allemand D, Ferrier-Pagès C, Furla P, Houlbrèque F, Puverel S, Reynaud S and Zoccola D (2004) Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. *Comptes Rendus Palevol*, 3, 453-467
- Aronson R, Bruckner A, Moore J, Precht B and E Weil (2008) *Porites branneri*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T132921A3494120 [doi:<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T132921A3494120.en>]
- Atlante A Basset, A Bobba, A Lassandro, R Mastrototaro, F and Vignes, F (2016) Functional characterization of the oxidative capacity of mitochondria and glycolytic assessment in benthic aquatic organisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48, 249-257
- Banha TNS, Capel KCC, Kitahara MV, Francini-Filho RB, Francini CLB, Sumida PYG and Mies M (2020) Low coral mortality during the most intense bleaching event ever recorded in subtropical Southwestern Atlantic reefs. *Coral Reefs*, 39, 515–521

- Bellwood DR, Streit RP, Brandl SJ and Tebbett SB (2019) The meaning of the term ‘function’ in ecology: a coral reef perspective. *Functional Ecology*, 33, 948-961
- Bertucci A, Moya, A Tambutté, S Allemand D, Supuran, CT and Zoccola D (2013) Carbonic anhydrases in anthozoan corals - A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1437-1450
- Blomberg SP, Garland Jr T, and Ives AR (2003) Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57, 717-745
- Camp M, Shein KA, Foster K and Hendee JC (2016) Does body type really matter? Relating climate change, coral morphology and resiliency. In: American Geophysical Union, Ocean Sciences Meeting 2016
- Castro CB and Pires DO (2001) Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *Bulletin of Marine Science*, 69, 357-371
- Cohen AL and Holcomb M (2009) Why corals care about ocean acidification: uncovering the mechanism. *Oceanography*, 22, 118-127
- Collins CL, Burnett NP, Ramsey MJ, Wagner K and Zippay ML (2020) Physiological responses to heat stress in an invasive mussel *Mytilus galloprovincialis* depend on tidal habitat. *Marine Environmental Research*, 154, 104
- Coni EOC, Ferreira CM, de Moura RL, Meirelles PM, Kaufman L and Francini-Filho RB (2013) An evaluation of the use of branching fire-corals (*Millepora* spp.) as refuge by reef fish in the Abrolhos Bank, eastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 96, 45-55
- Costa CF, Sassi R and Gorlach-Lira K (2008) Zooxanthellae genotypes in the coral *Siderastrea stellata* from coastal reefs in northeastern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 367, 149-152
- Curd A, Pernet F, Corporeau C, Delisle L, Firth LB, Nunes FL and Dubois SF (2019) Connecting organic to mineral: How the physiological state of an ecosystem-engineer is linked to its habitat structure. *Ecological Indicators*, 98, 49-60

- Dahlhoff EP, Stillman JH and Menge BA (2002) Physiological community ecology: variation in metabolic activity of ecologically important rocky intertidal invertebrates along environmental gradients. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 862-871
- Denis V, Ribas-Deulofeu L, Sturaro N, Kuo CY and Chen CA (2017) A functional approach to the structural complexity of coral assemblages based on colony morphological features. *Scientific Reports*, 7, 1-11
- Doo SS, Edmunds PJ and Carpenter RC (2019) Ocean acidification effects on in situ coral reef metabolism. *Scientific Reports*, 9, 1-8
- Duarte GA, Villela HD, Deocleciano M, Silva D, Barno A, Cardoso PM and Santoro EP (2020) Heat waves are a major threat to turbid coral reefs in Brazil. *Frontiers in Marine Science*, 7, 179
- Duarte G, Calderon EN, Pereira CM, Marangoni LF, Santos HF, Peixoto RS and Castro CB (2015) A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecology and evolution*, 5:4555-4566
- Elias M, Wieczorek G, Rosenne S and Tawfik DS (2014) The universality of enzymatic rate–temperature dependency. *Trends in Biochemical Sciences*, 39, 1-7
- Fabricius KE, Langdon C, Uthicke S, Humphrey C, Noonan S, De'ath G, Okazaki R, Muehllehner N, Glas MS and Lough JM (2011) Losers and winners in coral reefs acclimatized to elevated carbon dioxide concentrations. *Nature Climate Change*, 1, 165-169
- Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, 125, 1-15
- Fonseca JS, Marangoni LFB, Marques JA and Bianchini A (2019) Energy metabolism enzymes inhibition by the combined effects of increasing temperature and copper exposure in the coral *Mussismilia harttii*. *Chemosphere*, 236, 124420
- Gattuso JP, Yellowlees D and Lesser M (1993) Scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Marine Ecology Progress Series*, 92, 267-276

- Grafen A (1989) The phylogenetic regression. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences, 326, 119-157
- Grottoli AG, Rodrigues LJ and Palardy JE (2006) Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. Nature, 440, 1186-1189
- Hathaway JA and Atkinson DE (1965) Kinetics of regulatory enzymes: effect of adenosine triphosphate on yeast citrate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 20, 661-665
- Hawkins TD, Hagemeyer JC, Hoadley KD, Marsh AG and Warner ME (2016) Partitioning of respiration in an animal-algal symbiosis: Implications for different aerobic capacity between *Symbiodinium* spp. Frontiers in Physiology, 7 [doi: 10.3389/fphys.2016.00128]
- Hennige SJ, Smith DJ, Perkins R, Consalvey M, Paterson DM and Suggett DJ (2008). Photoacclimation, growth and distribution of massive coral species in clear and turbid waters. Marine Ecology Progress Series, 369, 77-88
- Henry L (2013) Metabolism in corals from Antarctica, the deep-sea, and the shallow subtropics: contrasts in temperature, depth, and light. PhD thesis, University of South Florida, p 86
- Hochachka PW and Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press
- Houlbrèque F and Ferrier-Pagès C (2009) Heterotrophy in tropical scleractinian corals. Biological Reviews, 84, 1-17
- Hughes AD and Grottoli AG (2013) Heterotrophic compensation: a possible mechanism for resilience of coral reefs to global warming or a sign of prolonged stress? PloS One, 8, e81172 [doi: 10.1371/journal.pone.0081172]
- Hughes TP, Anderson KD, Connolly SR, Heron SF, Kerry JT, Lough JM, Baird AH, Baum JK, Berumen ML, Bridge TC and Claar DC (2018) Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. Science, 359, 80-83

- IPCC (2014) Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing]
- Kitahara MV, Fukami H, Benzoni F and Huang D (2016) The new systematics of Scleractinia: integrating molecular and morphological evidence. In *The Cnidaria, past, present and future*. Springer, Cham. pp. 41-59
- Klymasz-Swartz AK, Allen GJ, Treberg JR, Yoon GR, Tripp A, Quijada-Rodriguez AR and Weihrauch D (2019) Impact of climate change on the American lobster (*Homarus americanus*): Physiological responses to combined exposure of elevated temperature and pCO₂. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 235, 202-210
- Lallier FH and Walsh PJ (1991) Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Marine Science*, 48, 665-669
- Lauer MM, de Oliveira CB, Yano NLI and Bianchini A (2012) Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 156, 140-147
- Leão ZM, Kikuchi RK and Oliveira MD (2019) The Coral Reef Province of Brazil. In *World Seas: an Environmental Evaluation*. Academic Press, pp. 813-833
- Leão ZM, Kikuchi RK and Testa V (2003) Corals and coral reefs of Brazil. In *Latin American Coral Reefs*. Elsevier Science, pp. 9-52
- Leão ZM, Kikuchi RK, Ferreira BP, Neves EG, Sovierzoski HH, Oliveira MD, Maida M, Correia MD and Johnsson R (2016) Brazilian coral reefs in a period of global change: A synthesis. *Brazilian Journal of Oceanography*, 64, 97-116
- Leão ZM, Kikuchi RKP, Oliveira M D and Vasconcellos V (2010) Status of Eastern Brazilian coral reefs in time of climate changes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5, 224-235

- Lewis JB (2006) Biology and ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Advances in Marine Biology*, 50, 1-55
- Lindenfors P, Revell LJ and Nunn CL (2010) Sexual dimorphism in primate aerobic capacity: a phylogenetic test. *Journal of Evolutionary Biology*, 23, 1183-1194
- Loya Y, Sakai K, Yamazato K, Nakano Y, Sambali H and Van Woesik R (2001). Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecology Letters*, 4, 122-131
- Marangoni LFB, Marques JA and Bianchini A (2016) Fisiologia de corais: a simbiose coral-zooxantela, o fenômeno de branqueamento e o processo de calcificação. In: Barreira, C., Zilberberg, C., Abrantes, D.P., Marques, J.A., Machado, L.F., Marangoni, L.F.B. (eds.). *Conhecendo os Recifes Brasileiros*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, pp. 60-63
- Marangoni LFDB, Mies M, Güth AZ, Banha TN, Inague A, Fonseca JDS and Bianchini A (2019) Peroxynitrite generation and increased heterotrophic capacity are linked to the disruption of the coral–dinoflagellate symbiosis in a scleractinian and hydrocoral species. *Microorganisms*, 7, 426 [doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100426>]
- Mies M, Francini-Filho RB, Zilberberg C, Garrido AG, Longo GO, Laurentino E and Banha TN (2020). South Atlantic coral reefs are major global warming refugia and less susceptible to bleaching. *Frontiers in Marine Science*, 7, 514 [doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00514>]
- Mies M, Güth AZ, Tenório AA, Banha TN, Waters LG, Polito PS and Sumida PYG (2018). In situ shifts of predominance between autotrophic and heterotrophic feeding in the reef-building coral *Mussismilia hispida*: an approach using fatty acid trophic markers. *Coral Reefs*, 37, 677-689
- Morley SA, Lurman GJ, Skepper JN, Pörtner HO and Peck LS (2009). Thermal plasticity of mitochondria: a latitudinal comparison between Southern Ocean molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 152, 423-430

- Morrow KM, Muller E and Lesser MP (2018) How does the coral microbiome cause, respond to, or modulate the bleaching process? In: Coral Bleaching . Springer, Cham., pp. 153-188
- Nelson DL and Cox MM (2014) Parte II: Bioenergética e metabolismo. In: Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6ª edição. Editora Artmed, p. 501
- Nelson HR and Altieri AH (2019) Oxygen: the universal currency on coral reefs. Coral Reefs, 38, 177-198
- Nogueira MM, Neves E and Johnsson R (2015) Effects of habitat structure on the epifaunal community in *Mussismilia* corals: does coral morphology influence the richness and abundance of associated crustacean fauna? Helgoland Marine Research, 69, 221-229
- Oliveira UDR, Gomes PB, Silva Cordeiro RT, de Lima GV and Pérez CD (2019) Modeling impacts of climate change on the potential habitat of an endangered Brazilian endemic coral: Discussion about deep sea refugia. PloS One, 14, e0211171[doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211171>]
- Pace DA, Marsh AG, Leong PK, Green AJ, Hedgecock D and Manahan DT (2006) Physiological bases of genetically determined variation in growth of marine invertebrate larvae: a study of growth heterosis in the bivalve *Crassostrea gigas*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 335, 188-209
- Palardy JE, Grottoli AG, Matthews KA (2005) Effects of upwelling, depth, morphology and polyp size on feeding in three species of Panamian corals. Marine Ecology Progress Series, 300, 79-89
- Pandolfi JM, Connolly SR, Marshall DJ and Cohen AL (2011) Projecting coral reef futures under global warming and ocean acidification. Science, 333, 418-422
- Paradis E and Schliep K (2018) ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. Bioinformatics, 35, 526-528
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2015). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-148. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>

- Pörtner HO and Gutt J (2016) Impacts of climate variability and change on (marine) animals: physiological underpinnings and evolutionary consequences. *Integrative and Comparative Biology*, 56, 31-44
- Pörtner HO (2001) Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88, 137-146
- Pörtner HO, Bock C and Mark FC (2017) Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *Journal of Experimental Biology*, 220, 2685-2696
- Putnam HM, Barott KL, Ainsworth TD and Gates RD (2017) The vulnerability and resilience of reef-building corals. *Current Biology*, 27, R528-R540
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- Reaka-Kudla ML (1997) The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. *Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources*, 2, pp.551
- Revell LJ (2010) Phylogenetic signal and linear regression on species data. *Methods in Ecology and Evolution*, 1, 319-329
- Revell LJ (2012) Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 217-223
- Rezende EL and Diniz-Filho JAF (2012) Phylogenetic analyses: comparing species to infer adaptations and physiological mechanisms. *Comprehensive Physiology*, 2, 639-674
- Rivest EB and Hofmann GE (2014) Responses of the metabolism of the larvae of *Pocillopora damicornis* to ocean acidification and warming. *PloS One*, 9, e96172. [doi:10.1371/journal.pone.0096172]
- Rodrigues LJ and Grottoli AG (2007) Energy reserves and metabolism as indicators of coral recovery from bleaching. *Limnology and Oceanography*, 52, 1874-1882
- Segel IH (1975) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*. New York, Wiley 115, A472-A473

- Soares M, da Cruz Lotufo, TM, Vieira LM, Salani S, Hajdu E, Matthews-Cascon H, Leão ZM and Kikuchi RKP (2017) Brazilian Marine Animal Forests: A New World to Discover in the Southwestern Atlantic. In: Marine Animal Forests: The Ecology of Benthic Biodiversity Hotspots, pp.73-110
- Sokolova IM (2013) Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53, 597-608
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G and Sukhotin AA (2012) Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1-15
- Srere PA (1971) An eclectic view of metabolic regulation: control of citrate synthase activity. *Advances in Enzyme Regulation*, 9, 221-233
- Storey KB and Brooks SPJ (1995) Evidence for aestivation specific proteins in *Otala lactea*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 143, 15-20
- Stolarski J, Kitahara MV, Miller DJ, Cairns SD, Mazur M and Meibom A (2011) The ancient evolutionary origins of Scleractinia revealed by azooxanthellate corals. *BMC evolutionary biology*, 11: 316 [doi: 10.1186/1471-2148-11-316]
- Tambutté S, Holcomb M, Ferrier-Pagès C, Reynaud S, Tambutté É, Zoccola D and Allemand D (2011) Coral biomineralization: from the gene to the environment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408, 58-78
- Tedesco EC, Segal B, Calderon EN and Schiavetti A (2017) Conservation of Brazilian coral reefs in the Southwest Atlantic Ocean: a change of approach. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45, 228-245
- van Oppen MJ, Oliver JK, Putnam HM and Gates RD (2015) Building coral reef resilience through assisted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 2307-2313
- Vetter RAH (1994) Ecophysiological studies on citrate-synthase:(I) enzyme regulation of selected crustaceans with regard to temperature adaptation. *Journal of Comparative Physiology B*, 165, 46-55

- Wiegand G and Remington SJ (1986) Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 15, 97-117
- Winter APM, Chaloub RM and Duarte GAS (2016) Photosynthetic responses of corals *Mussismilia harttii* (Verrill, 1867) from turbid waters to changes in temperature and presence/absence of light. *Brazilian Journal of Oceanography*, 64, 203-216
- Woodhead AJ, Hicks CC, Norström AV, Williams GJ and Graham NA (2019) Coral reef ecosystem services in the Anthropocene. *Functional Ecology*, 33, 1023-1034.
- Yellowlees D, Rees TAV and Leggat W (2008) Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, Cell and Environment*, 31, 679-694.

APÊNDICE 1

Manuscrito formatado e submetido de acordo com as normas do periódico *Coral Reefs* intitulado

“Is citrate synthase an energetic biomarker in Southwestern Atlantic corals? A comparative biochemical approach under a simulated climate change scenario”

Is citrate synthase an energetic biomarker in Southwestern Atlantic corals? A comparative biochemical approach under a simulated climate change scenario

Mariana Semola Angonese¹, Samuel Coelho Faria² and Adalto Bianchini*^{3,4}

¹Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

²Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo, 11600-000, São Sebastião, SP, Brazil

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

⁴Instituto Coral Vivo, 45807-000, Santa Cruz Cabrália, BA, Brazil

*Correspondence to: angonese.mariana@gmail.com

25 **Abstract**

26 The Southwestern Atlantic (SWA) corals are more tolerant to events of climate changes
27 than those from oligotrophic reefs owing some phenotypic adaptations regarding
28 heterotrophy and flexibility of symbiotic associations. Although aerobic metabolism also
29 plays a vital role in providing energy to survival and tolerance against climate changes in
30 ectotherms, it remains comparatively uninvestigated among SWA corals. Citrate synthase
31 (CS), a pacemaker enzyme of aerobic metabolism and present in almost all living cells, can
32 be used a proxy of maximum aerobic capacity through its activity, therefore predicting
33 tolerance against climate changes. Thus, we hypothesized that species from SWA reefs,
34 specifically from the Brazilian coast, show an increase in CS activity after simulated
35 climate changes (+2.5 °C and -0.3 pH unit for 15 days), and that endemic representatives
36 show higher enzyme activity than those with amphi-Atlantic distribution. Seven
37 scleractinian species and a hydrocoral were biochemically evaluated under a phylogenetic
38 perspective. Most species were unresponsive regarding CS activity, whereas some species
39 demonstrated a compensatory effect. However, CS kinetics discriminates groups of species
40 with different biogeographic origins since endemic representatives from SWA reveal
41 higher CS activity than those with wider Atlantic distribution, regardless their phylogenetic
42 relationships. We suggest that the exclusive evolutionary history on Brazilian coast
43 contributes to the tolerance against climate changes of endemic species, reinforcing the
44 hypothesis of SWA as a refuge for reef life. Therefore, we shown that CS is not an
45 interesting energetic biomarker to assess putative effects of climate changes owing its
46 species-specific responses, but it is an informative metric to point out species with different
47 biogeographic origins. Particularly to SWA reefs, such comparative, biochemical approach
48 highlights the greater tolerance of endemic species under a subcellular level of
49 organization, and should underpin the lower levels of bleaching when compared to typical,
50 oligotrophic worldwide reefs.

51

52

53 **Keywords:** Climate change, Global warming and acidification, Endemism, Krebs cycle,

54 Physiological plasticity

55

56 **Introduction**

57 Anthropocene is the geological period that human activities are primarily
58 responsible for impacting Earth's life and environments, intensifying climate changes
59 (Woodhead et al. 2019). According to the Intergovernmental Panel on Climate Change
60 (IPCC, 2014), the accumulation of carbon dioxide (CO₂) in the atmosphere caused by
61 burning fossil fuels and deforestation predicts an increase of 2.5°C in ocean temperature
62 and a reduction of 0.3 pH unit by 2100. Coral reefs are among the world's ecosystems
63 most threatened by climate changes and are considered a unique ecological system
64 responsible for providing vast heterogeneity of habitats and harboring complex
65 ecological relationships (Hughes et al. 2018). They are so astonishing that they have
66 already survived several mass extinctions events with many geological, climatic
67 fluctuations of temperature and atmospheric CO₂ concentration (Putnam, 2017).

68 The Southwestern Atlantic (SWA) coral reefs, particularly, show differential
69 characteristics compared to those from Indo-Pacific and Caribbean areas (Leão et al.
70 2019, Mies et al. 2020). In relation to the species from the Brazilian coast, despite its
71 low diversity of scleractinian corals (Castro and Pires 2001, Leão et al. 2019), they are
72 highly resistant and adapted to local oceanic conditions (Vasconcelos et al. 2018).
73 Emblematic environmental traits like intense hydrodynamics and high terrestrial
74 sedimentation (Winter et al. 2016) could have driven coral's morphology forms
75 (Palardy et al. 2005; Leão et al. 2019; Mies et al. 2020), besides species being
76 considered more tolerant to events of climate changes than those from oligotrophic reefs
77 (Hennige et al. 2008, Camp et al. 2016, Mies et al. 2020). Also, the higher nitrate
78 content from SWA waters tends to make corals less vulnerable to impacts caused by
79 nutrient starvation, besides showing lower bathymetric limits that acts as refuge against

80 elevated temperatures (Mies et al. 2020). Finally, SWA corals possess more flexible
81 symbiotic associations, being generalist phylotypes important for acclimatization and
82 adaptation to environmental disturbances (Costa et al. 2008; Teschima et al.2019; Mies
83 et al. 2020).

84 Energy metabolism, in special, plays a key role in the organismal homeostasis
85 against environmental variations and/or disturbances (Sokolova et al. 2013). Under
86 stressful conditions, the energy system may remain unbalanced and energy acquisition,
87 conservation or conversion could be impaired (Sokolova et al. 2012). Acquisition of
88 energy is interesting in symbiotic scleractinian corals since they are mixotrophic
89 animals, obtaining energy through two distinct pathways: autotrophically via
90 photosynthetic organic products, i.e. glucose and glycerol , which are transferred to the
91 host coral; and heterotrophically since corals actively pursue their food, composed
92 mainly by zooplankton (Houlbrèque and Ferrier-Pagès, 2009). However, regardless the
93 route of energy acquisition, corals need to promote the degradation of these complex
94 biomolecules, mainly glucose, into simplified products with energy release (Nelson and
95 Cox, 2014). Thus, understanding how climate change affects the energy metabolism of
96 natural populations of SWA reefs could elucidate how corals under non-emblematic
97 reefs conditions respond to the effects of higher temperature and acidification.

98 In aerobic metabolism, each molecule of pyruvate, previously formed in the
99 glycolysis stage, is converted into acetyl-coenzyme A (ACoA) with formation of
100 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and CO₂. The citrate synthase (CS)
101 performs the first reaction of the Krebs cycle, forming citrate from oxaloacetate and
102 ACoA. In the Krebs cycle, citrate is reduced to oxaloacetate again, forming the reduced
103 coenzymes NADH and flavine adenine dinucleotide (FADH₂), in addition to CO₂ and

104 ATP. In the Krebs cycle, each pyruvate produces one CO₂, three molecules of NADH
105 and one molecule of FADH₂. Regarding CS, it is present in almost all living cells,
106 playing a key role in the metabolic pathway of aerobic organisms, controlling the speed
107 of all reactions in Krebs cycle, and being considered a pacemaker enzyme (Nelson and
108 Cox, 2014). The amount of CS reflects the cellular oxidative capacity, being the activity
109 regulated by ATP concentration (Hathaway and Atkinson, 1965; Srere 1971). It also
110 catalyzes an important stage within the cycle, the Claisen Condensation of ACoA with
111 oxaloacetate to form citrate, being the only enzyme in the cycle that catalyze the
112 formation of a carbon-carbon bond (Wiegand and Ramington, 1986). Since CS activity
113 connects cellular and systemic metabolism, it reflects the capacity of acclimatization
114 and potentially adaptation to new environmental conditions (Morley et al. 2009), being
115 a potential predictor of maximum aerobic capacity (Vetter, 1994).

116 In fact, CS activity has already been evaluated in several marine invertebrates
117 under different conditions (Dahlhoff et al. 2002, Pace et al. 2006, Rosa et al. 2013,
118 Atlante et al. 2016, Hawkings et al. 2016, Collins et al. 2020, Curd et al. 2019,
119 Klymasz-Swartz et al. 2019). However, studies exploring CS activity in adult
120 scleractinian corals to assess aerobic energetic metabolism are scarce. Gattuso et al.
121 (1993) evaluated CS activity in a gradient of depth using the Indo-Pacific coral
122 *Stylophora pistillata*; Henry (2013) evaluated the metabolism using CS activity as a
123 proxy in the zooxanthellate coral *Cladocera arbuscula* from shallow sub-tropic, and in
124 the azooxanthellate representatives *Lophelia pertusa* from the deep sea and *Flabellum*
125 *impensum* from Antarctica. The first and unique paper published for a Brazilian coral
126 species was performed by Fonseca et al. (2019), being CS activity evaluated in the

127 endemic brain-coral *Mussismilia harttii* under a combined experiment of exposure to
128 copper and temperature increase.

129 Here, we provide the first comparative evaluation of CS activity using seven
130 corals and a hydrocoral species, embracing endemic or amphi-Atlantic representatives.
131 Since SWA species show greater tolerance to extreme environmental conditions when
132 compared to other worldwide reefs (Banha et al. 2019; Mies et al. 2020), we
133 hypothesized that endemic species show an increase in CS activity after simulated
134 climate changes, as well as a higher CS activity than amphi-Atlantic representatives.

135 **Materials and methods**

136 **Coral/hydrocoral species, laboratory maintenance and climate change simulation**

137 We sampled four endemic species from SWA reefs, which corresponds to 80%
138 of local endemic diversity (Leão et al. 2003, 2016, 2018): *Favia gravida*, *Mussismilia*
139 *harttii*, *Mu. hispida* and *Siderastrea stellata*. The other four collected species show
140 wider Atlantic distribution, being so-called amphi-Atlantics (Nunes et al. 2011; Souza et
141 al. 2017; Goodbody-Gringley et al. 2018): the coral species *Montastraea cavernosa*,
142 *Porites astreoides*, and *Po. branneri*, and the hydrocoral *Millepora alcicornis*. Although
143 it is not a true coral, the hidrocoral has important ecological relevance in Brazilian reefs
144 being the second largest coral reef constructor after *Mu. harttii* (Lewis, 2006).

145 Those species (N~8 fragments/colonies per species) were sampled at Parque
146 Municipal Natural do Recife de Fora, Porto Seguro, BA, Brazil (16° 24' 47" S, 38° 59'
147 16" W, **Figure 1**), at the end of spring time of 2017, by autonomous scuba diving
148 between 2 and 5 m deep, keeping a distance of ~200 meters among colonies. The corals
149 were transported in boxes full of seawater from the collecting site to the laboratory base

150 of Coral Vivo Project in Arraial d'Ajuda (Porto Seguro, BA, Brazil). At the sampling
151 moment, temperature, pH, salinity and light were 26.3 ± 0.2 °C, 8.11 ± 0.02 , 38.4 ± 0.1
152 ‰ S, and 105 ± 21 PAR, respectively.

153 Nubbins (N=12 per species) representatives from different sampled
154 colonies/fragments were immediately and individually fixed on acrylic plates inside six
155 80 L-aquaria in a continuous flow (25 L/h) with local sea water in an opened system
156 and acclimated for 21 days before the experiment. Each aquarium contained nubbins of
157 all species. The continuous flow in an opened system from the laboratory base of Coral
158 vivo Project maintains all physicochemical characteristics of the natural environment,
159 such as availability of organic matter, zooplankton density, salinity, and turbidity
160 (Duarte et al. 2015). Temperature and pH were, however, controlled at 26 ± 0.1 °C and
161 8.1 ± 0.05 , respectively, via resistors/chillers and carbon dioxide reactors, both
162 monitored digitally and continuously (Full Gauge MT 512E 2HP, and Ista Aquarium
163 Digital pH, respectively). Light level was also maintained constantly at 110 PAR (LI-
164 COR, LI 250A Light Meter, LI-193 Underwater Spherical Quantum Sensor), under 12-
165 hr light/12-hr dark photoperiod. Counterproofs for temperature and pH were applied
166 daily using a portable multiparameter (Sanxin SX751).

167 After the acclimation period, random coral nubbins (N=4 per species) were
168 transferred to three aquaria, where the parameters were controlled exactly as in the
169 above description, and for other three aquaria (N=4 per species) where they were
170 exposed to the combined treatment of increased temperature ($+2.5$ °C) and acidification
171 (-0.3 pH units) for 15 days. Such treatment followed a moderated scenario contemplated
172 by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2014). At the end of

173 experimental time, coral samples were immediately stored in -80 °C for further enzyme
174 activity analysis.

175 **Biochemical analysis**

176 ***Samples preparation***

177 The sample preparation for enzymatic analysis was performed as described by
178 Fonseca et al. (2019). Each aliquot of sample (~0.5 g) was ultrasonically homogenized
179 (Q Sonic, CL-188) with 150 µL of cold homogenization buffer (Imidazole 50 mM and
180 phenylmethylsulfonylfluoride – PMSF (1:1, v/v). After sonicating, samples were
181 centrifuged at 10,000 x g, 4°C for 20 min (Sigma3K30) and the supernatant was used as
182 enzymatic source.

183

184 ***Citrate Synthase (CS) activity***

185 The CS activity was measured using the protocols described by Lallier and
186 Walsh (1991), and modified by Lauer et al. (2012), measuring spectrophotometrically
187 the absorbance of TNB at 412 nm during 5 min at 25 °C using a microplate reader
188 (ELx808IU, 338 BioTekInstruments, Winooski, VT, USA). The final volume of the
189 reaction buffer in each well was 270 µL of HEPES 50 mM, 15 µL of ACoA and 10 µL
190 of DTNB 3.5 mM, and then 5 µL of the homogenized sample was added. The reaction
191 was initiated after pipetting 50 µL of oxaloacetate solution. The concentrations of the
192 substrates (ACoA and oxaloacetate), specifically, were standardized (see section
193 ‘Standardization of substrates’ below).

194 The enzymatic activity was calculated according to the equation below.

195 Relative Activity (%) = $(\alpha \times V)/(\epsilon \times W \times \text{vol})$, where:

196 α is the equation slope; V is the final volume of the reaction solution
197 (350 μL); ϵ is the extinction coefficient (13.6 for DTNB at 412 nm); L
198 is the optical length (1 cm for 96-well microplate and volume of 350
199 μL) and vol is the sample volume used (5 μL).

200

201 Then, the relative activity was normalized by protein concentration. For protein
202 concentration, each sample (2 μL) was previously centrifuged in 13,000 g at 4°C and
203 the quantification of protein concentrations was performed using an UV-Vis Biodrop
204 μLite spectrophotometer. Enzyme activity was given in enzymatic units (U mg^{-1}
205 protein).

206

207 **Standardization of substrates**

208 Optimal substrate concentrations (ACoA and oxaloacetate) for CS activity were
209 standardized for each species to avoid an effect of substrate on interspecific
210 comparisons, evaluating the kinetics of the condensation reaction via steady-state
211 conditions (e.g. linear relationship between product formation and time) (Segel, 1976).
212 A pool of fragments of all replicates was performed for both control and treatment
213 samples (N = 4 for each condition). CS activity was evaluated through the variation of
214 ACoA substrate using six different concentrations (0.1; 0.5; 1.0; 1.3 ; 2.3 and 3.3 mM)
215 while the substrate oxaloacetate was fixed at 3.5 mM. Once the optimal ACoA substrate
216 activity was found for each species, it was then fixed, and again the CS activity was
217 assessed through oxaloacetate variation (1.5; 2.5; 3.5; 4.5 and 5.5 mM).

218 The optimal ACoA and oxaloacetate substrate concentrations for each species
219 (control and treatment) are present in Table 1.

220

221 **Statistical analyses**

222 The effect of the combined treatment on CS activity was evaluated applying a
223 one-way Analysis of Variance (ANOVA) for each species. For interspecific
224 evaluations, since the correlation between physiological divergence and evolutionary
225 time makes “species” as statistical dependent units (Felsenstein, 1985), we assumed the
226 pruned coral tree from Kitahara et al (2016) in order to maintain only the species here
227 evaluated biochemically, and conduct appropriately cross-species comparisons
228 (Rezende and Diniz-Filho 2012). *Millepora alcicornis* was artificially used as outgroup,
229 and branch lengths were transformed following Grafen (1989).

230 To test if closely related coral species tend to show similar CS activities than
231 those randomly chosen from the tree (*i.e.* phylogenetic signal), we applied Blomberg’s
232 et al. (2003) *K*. The hypothesis that simulated climate changes promote a compensatory
233 effect on CS activity was evaluated via paired phylogenetic t-test (Lindenfors et al.
234 2010), whereas the effect of origin (endemic x amphi-Atlantic) on enzyme activity was
235 evaluated via phylogenetic generalized least squares model (pGLS) simultaneously
236 employing the α parameter, or the restriction force (Revell, 2010).

237 All analyses were performed using the R platform (R development Core Team
238 2020), setting the minimum significance level at 95% ($\alpha = 0.05$), using the packages
239 *phytools* (Revell, 2012), *ape* (Paradis et al.2004), and *nlme* (Pinheiro et al.2015). All

240 coral findings were log-transformed to verify the assumptions of normality and
241 homoscedasticity. Data are expressed as mean $\pm$ standard error.

242

243 **Results**

244 The highest mean values for CS activity were observed in the Brazilian endemic
245 species *Siderastrea stellata* and *Favia gravida* (0.07 ± 0.01 and 0.06 ± 0.01 U mg⁻¹,
246 respectively), while the lowest value was found in the amphi-Atlantic representatives
247 *Porites branneri* and *Millepora alcicornis* (0.002 ± 0.001 and 0.001 ± 0.000 U mg⁻¹,
248 respectively), all from the control conditions (**Figure 2, Table 2**). Interestingly, the
249 same amphi-Atlantic species *P. branneri* and *M. alcicornis* showed an increase of ~8.5-
250 fold in CS activity after treatment exposure (ANOVA, $39.1 \leq F \leq 152.4$, $P < 0.001$).
251 Only *Mu. hispida* from the endemic representatives demonstrated an increase (2-fold) in
252 enzyme activity ($F = 21.7$, $p = 0.003$) (**Figure 2, Table 2**). However, in a comparative
253 perspective, there is not an effect of combined treatment on CS activity (phylogenetic
254 paired t-test, $t = -0.18$, $df = 5$, $p = 0.87$):

255 There is not a significant phylogenetic signal for CS activity at both control and
256 treatment conditions ($K = \sim 1.0$, $p \geq 0.26$), which means that closely related species do
257 not share similar CS kinetics. Illustratively, *F. gravida* and *S. stellata* showed the
258 highest CS values at both conditions and, despite both being endemic corals, they
259 belong to different clades, underpinning the homoplasy of increased, similar CS
260 activities (**Figure 3**).

261 However, endemic and amphi-Atlantic species respond differently regarding CS
262 activity, at both control and treatment conditions (PGLS, $4.0 \leq F \leq 10.2$, $p \leq 0.02$, $\alpha =$

263 ~3.6). Endemic species show mean CS values up to 3-fold higher than those amphi-
264 Atlantic representatives (**Figures 2 and 3**).

265

266 **Discussion**

267 Considering our moderate scenario of simulated ocean warming and
268 acidification, most corals were unresponsive regarding citrate synthase (CS) activity,
269 whereas some species demonstrated a compensatory effect owing the increased activity.
270 However, CS kinetics discriminates groups of species with different origins since
271 endemic representatives from the South Western Atlantic (SWA) reefs reveal higher CS
272 activity than those with wider Atlantic distribution, regardless their phylogenetic
273 relationships. Owing the kinetics plasticity of CS considering coral phylogeny, we
274 suggest that the exclusive evolutionary history on Brazilian coast contributes to the
275 tolerance against climate changes, reinforcing the hypothesis of SWA as a refuge for
276 reef life (Mies et al. 2020).

277 Temperature and pH are considered key variables for enzymatic functioning
278 (Hochachka and Somero et al. 2002). Temperature is the main abiotic factor affecting
279 from subcellular to systemic metabolism since it drives saturation state of biological
280 membranes, molecules kinetics and tissue demand for O₂ in ectotherms (Vetter 1994,
281 Pörtner et al. 2001, Elias et al. 2014). Regarding pH, it is known that seawater
282 acidification is harmful to calcifying corals since it promotes pH reduction at the
283 calcification site, altering the acid-base equilibrium and, consequently, augmenting
284 metabolic costs (Allemand et al. 2004, Cohen et al. 2009). The coral species *P. branneri*
285 and *Mu. hispida*, as well as the hydrocoral *Mi. alcicornis*, showed a typical increase on

286 CS activity after treatment exposition of combined temperature increase and pH
287 reduction, revealing a compensatory effect against climate changes.

288 Such elevation in ectotherms tends to preserve basic cellular processes and
289 organismal homeostasis under adverse environmental stressors (Storey and Brooks,
290 1995). Since physiological responses to this combined scenario are species-specific
291 (Morley et al. 2009; Schoepf et al. 2013; Pörtner et al. 2017), the absence of effect on
292 the other evaluated species should be consequence of an alternative metabolic
293 mechanisms/regulation of energy production, like an anaerobic strategy, that was not
294 evaluated in this study. Mechanistically, higher CS activity performs the Claisen
295 condensation between acetyl CoA and oxaloacetate under faster rates, giving rise to
296 citrate and the subsequent complete oxidation of the organic substrate into CO₂ and
297 reduced NADH co-factors, with further ATP generation (Nelson and Cox, 2014).

298 Under a comparative scenario, however, CS activity is up to 3-fold higher in the
299 endemic species than in those with amphi-Atlantic distribution, revealing a significant
300 effect of origin on interspecific variability. Since energy demand correlates with coral
301 aerobic metabolism (Fonseca et al. 2019), higher enzyme activities should be supplied
302 by higher the levels of heterotrophy (Grotolli et al. 2006; Rodrigues et al. 2007) which
303 becomes fundamental for long-term coral survival and recovery (Houlbrèque and
304 Ferrier-Pagès, 2009; Hughes and Grotolli, 2013). The high level of sedimentation,
305 turbidity, nutrients (such as nitrate and phosphate) and the deeper bathymetric
306 distribution limits (up to 70 m) of the SWA (Winter et al. 2016; Tedesco et al. 2017;
307 Duarte et al. 2020, Mies et al. 2020) have probably shaped a unique heterotrophic
308 evolution. In fact, endemic Brazilian corals of the genus *Mussismilia* present high levels
309 of heterotrophy (Mies et al. 2018, Marangoni et al. 2019), a putative recurrent pattern in

310 the other endemic representatives also historically adapted to a particular physico-
311 chemical ocean. Thus, an increased aerobic capacity through CS activity follows as a
312 corollary. The greater energy reserve in SWA coral tissues, once they present massive
313 morphology (Loya et al. 2001; Rodrigues et al. 2007), could also contribute to higher
314 CS activity.

315 Under an evolutionary perspective, the effect of origin on the evolution of CS
316 activity is in concert with the non-significant phylogenetic signal, which means that
317 phylogenetically closely related species do not share similar enzyme activities. In fact,
318 the coral species *F. gravida* and *S. stelatta*, for example, despite being endemic to
319 Brazilian coast, are not closely related since they belong to different clades (Fig. 2),
320 reinforcing the homoplasy (*i.e.* independent evolution) of the highest enzyme activities.
321 The physico-chemical nature of Brazilian waters is a potential driver that increases CS
322 activity and, presumably, the aerobic capacity, regardless phylogenetic structuring.
323 Even all species being sampled from the same SWA reef, the exclusive evolutionary
324 history of endemic species along the Brazilian coast configures as a relevant, inertial
325 local pressure.

326 In a species-specific appreciation, it is important to highlight the ecological
327 relevance of the three responsive species. In 2019, a mass mortality was recorded at
328 SWA reefs owing the highest sea surface temperatures documented for the last decade
329 (Duarte et al. 2020). The fire coral *Mi. alcicornis*, the second largest reef builder in the
330 SWA and the only one that presents branched morphology (contributing significantly to
331 reef complexity) (Leão et al. 2010), showed the highest mortality rates (~80%) (Duarte
332 et al. 2020). On the other hand, the endemic *Mu. hispida* showed much lower mortality
333 (~2%) for the same period, a putative consequence of its greater heterotrophic capacity

334 (Banha et al. 2019, Marangoni et al. 2019, Mies et al. 2018). Furthermore, with the
335 present data and assuming CS activity as a proxy of systemic metabolism, we can
336 understand such tolerance of the brain coral as a possible consequence of an elevated
337 aerobic capacity also. Despite no data regarding bleaching or mortality is available for
338 *P. branneri*, it is classified as near threatened species according to the IUCN Red List
339 (Aronson et al. 2008) and deserves particular attention.

340 This is the first work that evaluates coral enzyme activity for corals/hydrocorals
341 under a phylogenetic perspective. Here, we have shown that CS activity is not an
342 interesting energetic biomarker to assess putative effects of climate changes owing its
343 species-specific responses, however it configures as an informative metric to
344 discriminate species with different biogeographic origins. Particularly to SWA reefs,
345 such comparative biochemical approach highlights the greater tolerance of endemic
346 Brazilian species under a subcellular level of organization, and should underpin the
347 lower levels of bleaching when compared to typical, oligotrophic worldwide reefs.

348

349 **Acknowledgements**

350 The present study was supported in Brazil by Coordenação de Aperfeiçoamento de
351 Pessoal de Nível Superior (CAPES - Programa Ciências do Mar, Brasília, DF, Brazil;
352 grant #1984/ 2014 to AB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
353 Tecnológico (CNPq, #307647/2016-1 to AB), and Fundação de Amparo à Pesquisa do
354 Estado de São Paulo (FAPESP, #2017/05310-9 to SCF). We are grateful to Coral Vivo
355 Project and its sponsors Petrobras (Programa Petrobras Ambiental) and Arraial d'Ajuda
356 Eco Park. AB is a research fellow from CNPq (Proc. # 307647/2016-1). Corals were

collected under MMA/ICMBio # 59974-1 and Secretaria Municipal de Porto Seguro #03/2017 permissions to SCF. We are indebted to C. Pereira, L. Santos and L. Marangoni for helping with field work, laboratory experiment and sample processing. This work constitutes part of an MSc dissertation submitted by MSA to the Graduate Program in Biological Oceanography, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande-FURG.

Competing interests

No competing interests are declared.

Reference List

- Allemand D, Ferrier-Pagès C, Furla P, Houlbrèque F, Puverel S, Reynaud S and Zoccola D (2004) Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. *Comptes Rendus Palevol*, 3:453-467
- Aronson R, Bruckner A, Moore J, Precht B and E Weil (2008) **Porites branneri**. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T132921A3494120 [doi:<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T132921A3494120.en>]
- Atlante A, Basset A, Bobba A, Lassandro R, Mastrototaro F and Vignes F (2016) Functional characterization of the oxidative capacity of mitochondria and glycolytic assessment in benthic aquatic organisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48:249-257

378 Banha TNS, Capel KCC, Kitahara MV, Francini-Filho RB, Francini CLB, Sumida
 379 PYG and Mies M (2019) Low coral mortality during the most intense bleaching
 380 event ever recorded in subtropical Southwestern Atlantic reefs. *Coral Reefs*,
 381 39:515–521

382 Blomberg SP, Garland Jr T and Ives AR (2003) Testing for phylogenetic signal in
 383 comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57:717-745

384 Camp M, Shein KA, Foster K and Hendee JC (2016) Does body type really matter?
 385 Relating climate change, coral morphology and resiliency. In: American
 386 Geophysical Union, Ocean Sciences Meeting 2016

387 Castro CB and Pires DO (2001) Brazilian coral reefs: what we already know and what
 388 is still missing. *Bulletin of Marine Science*, 69:357-371

389 Cohen AL and Holcomb M (2009) Why corals care about ocean acidification:
 390 uncovering the mechanism. *Oceanography*, 22:118-127

391 Collins CL, Burnett NP, Ramsey MJ, Wagner K and Zippay ML (2020) Physiological
 392 responses to heat stress in an invasive mussel **Mytilus galloprovincialis** depend
 393 on tidal habitat. *Marine Environmental Research*, 154:104849

394 Costa CF, Sassi R and Gorlach-Lira K (2008) Zooxanthellae genotypes in the coral
 395 **Siderastrea stellata** from coastal reefs in northeastern Brazil. *Journal of*
 396 *Experimental Marine Biology and Ecology*, 367:149-152

397 Curd A, Pernet F, Corporeau C, Delisle L, Firth LB, Nunes FL and Dubois SF (2019)
 398 Connecting organic to mineral: How the physiological state of an ecosystem-
 399 engineer is linked to its habitat structure. *Ecological Indicators*, 98:49-60

400 Dahlhoff EP, Stillman JH and Menge BA (2002) Physiological community ecology:
401 variation in metabolic activity of ecologically important rocky intertidal
402 invertebrates along environmental gradients. Integrative and Comparative
403 Biology, 42:862-871

404 Duarte GA, Villela HD, Deocleciano M, Silva D, Barno A, Cardoso PM and Santoro
405 EP (2020) Heat waves are a major threat to turbid coral reefs in Brazil. Frontiers
406 in Marine Science, 7: 179 [doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00179>]

407 Duarte G, Calderon EN, Pereira CM, Marangoni LF, Santos HF, Peixoto RS and
408 Castro CB (2015) A novel marine mesocosm facility to study global warming,
409 water quality, and ocean acidification. Ecology and evolution, 5:4555-4566

410 Elias M, Wieczorek G, Rosenne S and Tawfik DS (2014) The universality of
411 enzymatic rate–temperature dependency. Trends in Biochemical Sciences, 39:1-
412 7

413 Felsenstein J (1985) Phylogenies and the comparative method. The American
414 Naturalist, 125:1-15

415 Fonseca JS, Marangoni LFB, Marques JA and Bianchini A (2019) Energy metabolism
416 enzymes inhibition by the combined effects of increasing temperature and
417 copper exposure in the coral **Mussismilia harttii**. Chemosphere, 236:124420.

418 Gattuso JP, Yellowlees D and Lesser M (1993) Scleractinian coral **Stylophora**
419 **pistillata**. Marine Ecology Progress Series, 92:267-276

420 Goodbody-Gringley G and Waletich J (2018) Morphological plasticity of the depth
 421 generalist coral, **Montastraea cavernosa**, on mesophotic reefs in
 422 Bermuda. Ecology, 99:1688-1690

423 Grafen A (1989) The phylogenetic regression. Philosophical Transactions of the Royal
 424 Society of London. B, Biological Sciences, 326: 119-157

425 Grottoli AG, Rodrigues LJ and Palardy JE (2006) Heterotrophic plasticity and
 426 resilience in bleached corals. Nature, 440:1186-1189

427 Hathaway JA and Atkinson DE (1965) Kinetics of regulatory enzymes: effect of
 428 adenosine triphosphate on yeast citrate synthase. Biochemical and Biophysical
 429 Research Communications, 20: 661-665

430 Hawkins TD, Hagemeyer JC, Hoadley KD, Marsh AG and Warner ME (2016)
 431 Partitioning of respiration in an animal-algal symbiosis: implications for
 432 different aerobic capacity between **Symbiodinium** spp. Frontiers in
 433 Physiology, 7:128 [doi:<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00128>]

434 Hennige SJ, Smith DJ, Perkins R, Consalvey M, Paterson DM and Suggett DJ (2008)
 435 Photoacclimation, growth and distribution of massive coral species in clear and
 436 turbid waters. Marine Ecology Progress Series, 369:77-88

437 Henry L (2013) Metabolism in corals from Antarctica, the deep-sea, and the shallow
 438 subtropics: contrasts in temperature, depth, and light. Ph.D. thesis, University of
 439 South Florida, p 86

440 Hochachka PW and Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and
 441 process in physiological evolution. Oxford University Press. pp.479

442 Houlbrèque F and Ferrier-Pagès C (2009) Heterotrophy in tropical scleractinian
 443 corals. *Biological Reviews*, 84:1-17

444 Hughes AD and Grottoli AG (2013) Heterotrophic compensation: a possible
 445 mechanism for resilience of coral reefs to global warming or a sign of prolonged
 446 stress?. *PloS One*, 8:e81172 [doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081172>]

447 Hughes TP, Anderson KD, Connolly SR, Heron SF, Kerry JT, Lough JM, Baird AH,
 448 Baum JK, Berumen ML, Bridge TC and Claar DC (2018) Spatial and temporal
 449 patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science*, 359:80-83

450 IPCC 2014 Climate Change (2014) Synthesis Report. Contribution of Working
 451 Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental
 452 Panel on Climate Change [Core Writing].

453 Kitahara MV, Fukami H, Benzoni F and Huang D (2016) The new systematics of
 454 Scleractinia: integrating molecular and morphological evidence. In *The*
 455 *Cnidaria, past, present and future* Springer, Cham, [doi:
 456 https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_4]

457 Klymasz-Swartz AK, Allen GJ, Treberg JR, Yoon GR, Tripp A, Quijada-Rodriguez
 458 AR and Weihrauch D (2019) Impact of climate change on the American lobster
 459 (***Homarus americanus***): physiological responses to combined exposure of
 460 elevated temperature and pCO₂. *Comparative Biochemistry and Physiology Part*
 461 *A: Molecular and Integrative Physiology*, 235:202-210

462 Lallier FH and Walsh PJ (1991) Metabolic potential in tissues of the blue crab,
 463 ***Callinectes sapidus***. *Bulletin of Marine Science*, 48:665-669

464 Lauer MM, de Oliveira CB, Yano NLI and Bianchini A (2012) Copper effects on key
 465 metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the
 466 estuarine crab **Neohelice granulata** at different salinities. Comparative
 467 Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 156:140-
 468 147

469 Leão ZM, Kikuchi RK and Oliveira MD (2019) Chapter 35 The coral reef province of
 470 Brazil. In: World Seas: an environmental evaluation. Elsevier, Academic Press,
 471 pp 813-833

472 Leão ZM, Kikuchi RK and Testa V (2003) Corals and coral reefs of Brazil. In: Latin
 473 American coral reefs. Elsevier Science, pp 9-52

474 Leão ZM, Kikuchi RKP, Oliveira M D and Vasconcellos V (2010) Status of Eastern
 475 Brazilian coral reefs in time of climate changes. Pan-American Journal of
 476 Aquatic Sciences, 5: 224-235

477 Leão ZM, Kikuchi RK, Ferreira BP, Neves EG, Sovierzoski HH, Oliveira MD, Maida
 478 M, Correia MD and Johnsson R (2016) Brazilian coral reefs in a period of global
 479 change: A synthesis. Brazilian Journal of Oceanography, 64:97-116

480 Lewis JB (2006) Biology and ecology of the hydrocoral **Millepora** on coral
 481 reefs. Advances in Marine Biology, 50:1-55

482 Lindenfors P, Revell LJ and Nunn CL (2010) Sexual dimorphism in primate aerobic
 483 capacity: a phylogenetic test. Journal of evolutionary biology, 23:1183-1194

484 Loya Y, Sakai K, Yamazato K, Nakano Y, Sambali H and Van Woesik R (2001) Coral
 485 bleaching: the winners and the losers. Ecology Letters, 4: 122-131

486 Marangoni LFB, Mies M, Güth AZ, Banha TN, Inague A, Fonseca JDS and Bianchini
 487 A (2019) Peroxynitrite generation and increased heterotrophic capacity are
 488 linked to the disruption of the coral–dinoflagellate symbiosis in a scleractinian
 489 and hydrocoral species. *Microorganisms*, 7:426 [doi:
 490 <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100426>]
 491 Mies M, Francini-Filho RB, Zilberberg C, Garrido AG, Longo GO, Laurentino E and
 492 Banha TN (2020) South Atlantic coral reefs are major global warming refugia
 493 and less susceptible to bleaching. *Frontiers in Marine Science*, 7:514
 494 Mies M, Güth AZ, Tenório AA, Banha TNS, Waters LG, Polito PS and Sumida PYG
 495 (2018) In situ shifts of predominance between autotrophic and heterotrophic
 496 feeding in the reef-building coral **Mussismilia hispida**: an approach using fatty
 497 acid trophic markers. *Coral Reefs*, 37: 677-689
 498 Morley SA, Lurman GJ, Skepper JN, Pörtner HO and Peck LS (2009) Thermal
 499 plasticity of mitochondria: a latitudinal comparison between Southern Ocean
 500 molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and*
 501 *Integrative Physiology*, 152: 423-430
 502 Nelson DL and Cox MM (2014) Parte II: Bioenergética e metabolismo. In: *Princípios*
 503 *de Bioquímica de Lehninger*. Artmed
 504 Nunes FL, Norris RD and Knowlton N (2011) Long distance dispersal and
 505 connectivity in amphi-Atlantic corals at regional and basin scales. *PloS One*, 6:
 506 e22298 [doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022298>]
 507 Pace DA, Marsh AG, Leong PK, Green AJ, Hedgecock D and Manahan DT (2006)
 508 Physiological bases of genetically determined variation in growth of marine

509 invertebrate larvae: a study of growth heterosis in the bivalve **Crassostrea**
 510 **gigas**. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 335:188-209
 511 Palardy JE, Grottoli AG, Matthews KA (2005) Effects of upwelling, depth,
 512 morphology and polyp size on feeding in three species of Panamian corals.
 513 Marine Ecology Progress Series, 300: 79-89
 514 Paradis E and Schliep K (2018) ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and
 515 evolutionary analyses in R. Bioinformatics 35: 526-528
 516 Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team (2015) nlme: Linear and
 517 nonlinear mixed effects models_. R package version 3.1-96 URL:
 518 <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
 519 Pörtner H (2001) Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen
 520 limitation of thermal tolerance in animals. Naturwissenschaften, 88:137-146
 521 Pörtner H, Bock C and Mark FC (2017) Oxygen-and capacity-limited thermal
 522 tolerance: bridging ecology and physiology. Journal of Experimental
 523 Biology, 220:2685-2696.
 524 Putnam HM, Barott KL, Ainsworth TD and Gates RD (2017) The vulnerability and
 525 resilience of reef-building corals. Current Biology, 27: R528-R540
 526 Revell LJ (2010) Phylogenetic signal and linear regression on species data. Methods in
 527 Ecology and Evolution, 1:319-329
 528 Revell LJ (2012) phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and
 529 other things). Methods in Ecology and Evolution, 3:217-223

530 Rezende EL and Diniz-Filho JAF (2012) Phylogenetic analyses: comparing species to
 531 infer adaptations and physiological mechanisms. *Comprehensive*
 532 *Physiology*, 2:639-674

533 Rodrigues LJ and Grottoli AG (2007) Energy reserves and metabolism as indicators
 534 of coral recovery from bleaching. *Limnology and Oceanography*, 52: 1874-1882

535 Rosa R, Trueblood L and Seibel BA (2009) Ecophysiological influence on scaling of
 536 aerobic and anaerobic metabolism of pelagic gonatid squids. *Physiological and*
 537 *Biochemical Zoology*, 82:419-429

538 Schoepf V, Grottoli AG, Warner ME, Cai WJ, Melman TF, Hoadley KD and Wang Y
 539 (2013) Correction: Coral energy reserves and calcification in a high-CO₂ world
 540 at two temperatures. *PloS One*, 9: e108082
 541 [doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108082>]

542 Segel IH (1975) *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and*
 543 *steady state enzyme systems*. Wiley, New York, 115: A472-A473

544 Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, Lannig G and Sukhotin AA (2012) Energy
 545 homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress
 546 tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79:1-15

547 Sokolova IM (2013) Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to
 548 integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and comparative*
 549 *biology*, 53:597-608

550 Souza JN, Nunes FL, Zilberberg C, Sanchez JA, Migotto, AE, Hoeksema BW and
 551 Lindner A (2017) Contrasting patterns of connectivity among endemic and

552 widespread fire coral species (**Millepora** spp.) in the tropical Southwestern
553 Atlantic. Coral Reefs, 36: 701-716

554 Srere PA (1971) An eclectic view of metabolic regulation: control of citrate synthase
555 activity. Advances in Enzyme Regulation, 9:221-233

556 Storey KB and Brooks SP (1995) The basis of enzymatic adaptation. Principles of
557 Medical Biology Elsevier, 44: 147-169

558 Tedesco EC, Segal B, Calderon EN and Schiavetti A (2017) Conservation of Brazilian
559 coral reefs in the Southwest Atlantic Ocean: a change of approach. Latin
560 American Journal of Aquatic Research, 45: 228-245

561 Teschima MM, Garrido A, Paris A, Nunes FL and Zilberberg C (2019) Correction:
562 Biogeography of the endosymbiotic dinoflagellates (Symbiodiniaceae)
563 community associated with the brooding coral **Favia gravida** in the Atlantic
564 Ocean. PloS One, 14: e0215167
565 [doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215167>]

566 Vasconcelos MJ, Leão ZM and Kikuchi RK (2018) Coral reef growth pattern in
567 eastern Brazil has not changed since the Holocene. Quaternary and
568 Environmental Geosciences, 9:49-61

569 Vetter RAH (1995) Ecophysiological studies on citrate-synthase:(I) enzyme regulation
570 of selected crustaceans with regard to temperature adaptation. Journal of
571 Comparative Physiology B, 165:46-55

572 Wiegand G and Remington SJ (1986) Citrate synthase: structure, control, and
573 mechanism. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 15:97-
574 117

575 Winter APM, Chaloub RM and Duarte GAS (2016) Photosynthetic responses of corals
576 **Mussismilia harttii** (Verrill, 1867) from turbid waters to changes in temperature
577 and presence/absence of light. Brazilian Journal of Oceanography, 64:203-216

578 Woodhead AJ, Hicks CC, Norström AV, Williams GJ and Graham NA (2019) Coral
579 reef ecosystem services in the Anthropocene. Functional Ecology, 33:1023-1034

580

581

582

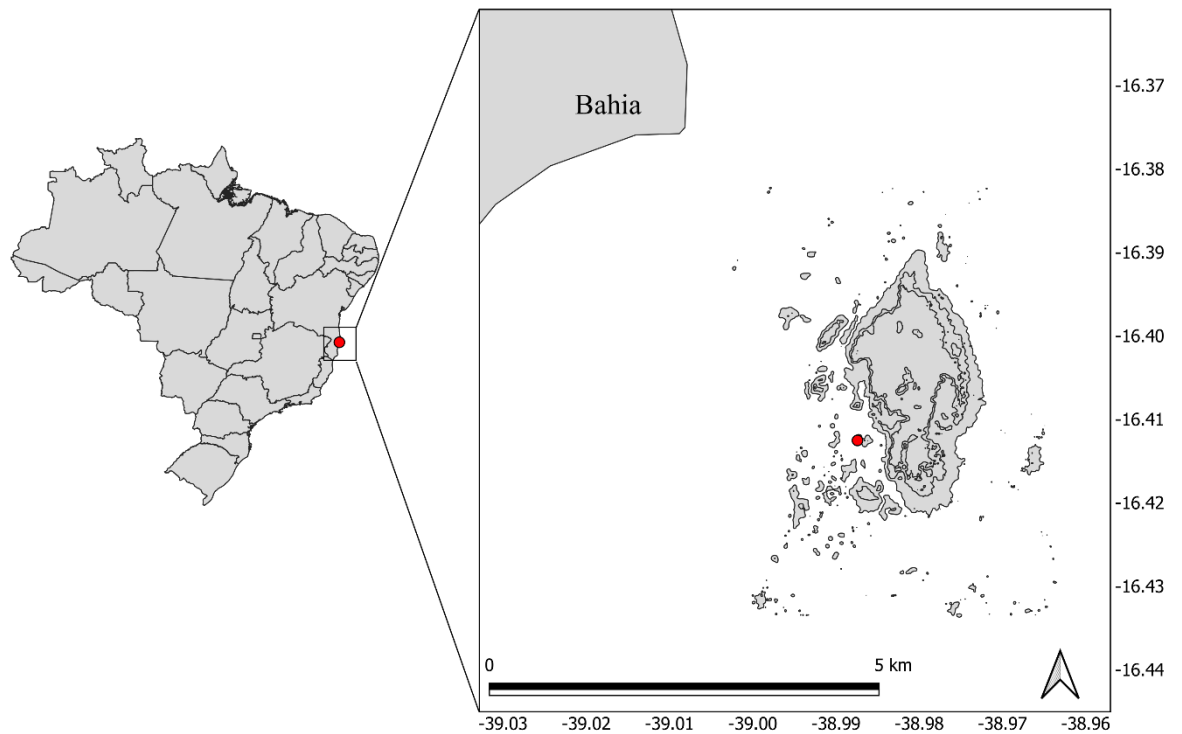
583

584

585

586

587



589

590

591 **Figure 1.** Collecting site (red) in the Parque Natural Municipal do Recife de Fora,
 592 Bahia, Brazil. The species sampled belong to two different groups regarding their
 593 geographical distribution: endemics from Southwestern Atlantic reefs (*Favia*
 594 *gravida*, *Mussismilia harttii*, *Mussismilia hispida* and *Siderastrea stellata*; and
 595 amphi-Atlantics (*Montastraea cavernosa*, *Porites astreoides*, *Porites branneri*, and
 596 *Millepora alcicornis*).

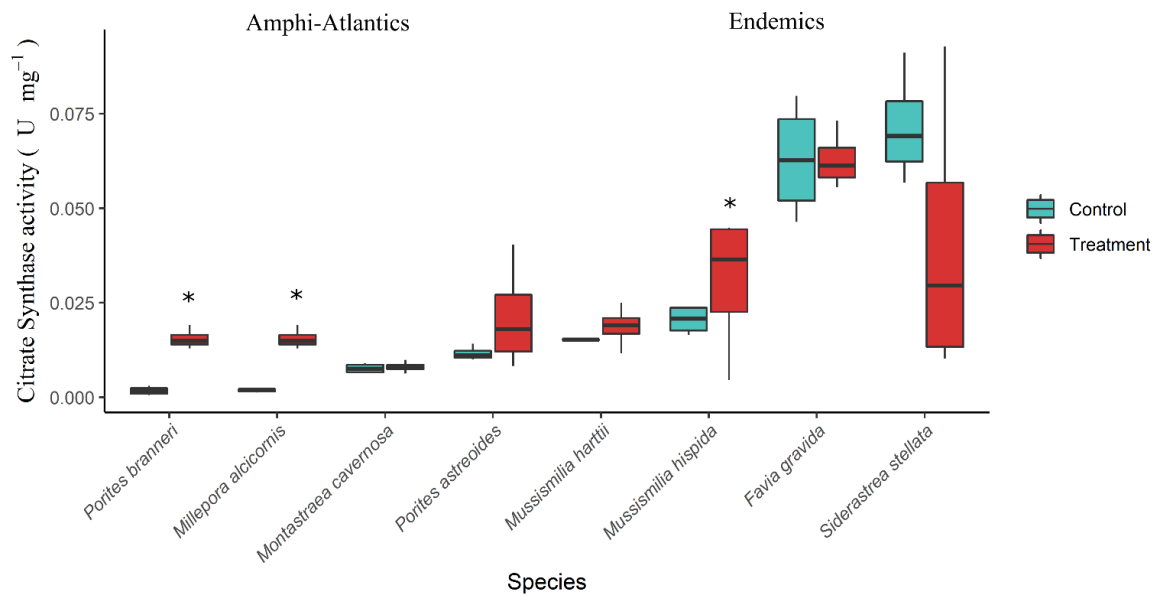
597

598

599

600

601

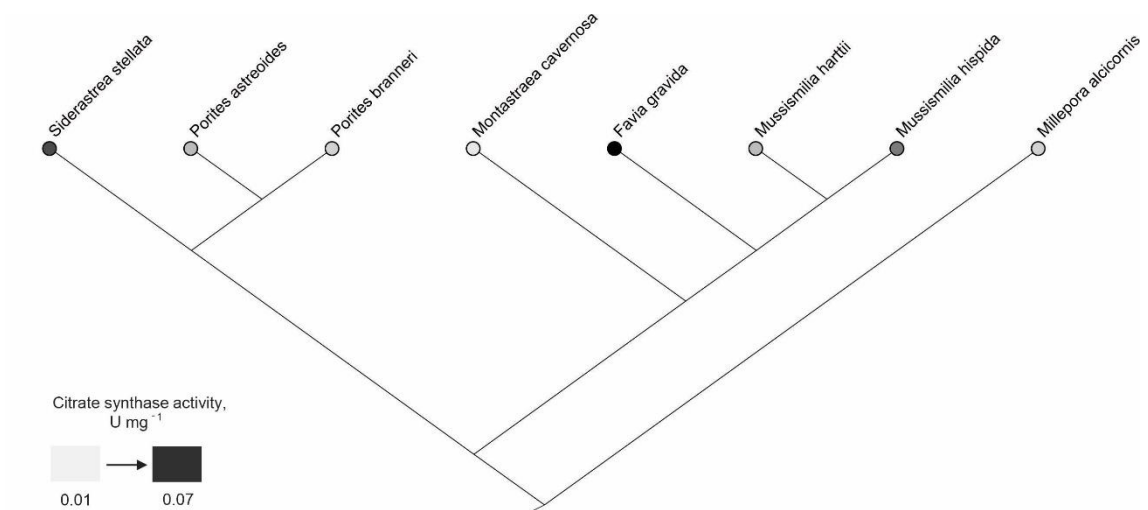


602

603 **Figure 2.** Citrate synthase activity (U mg⁻¹) of Southwestern Atlantic species. C and T
 604 represent control (26°C and pH 8.1) and treatment (28.5°C and pH 7.8) conditions,
 605 respectively, after 15 days of exposure, simulating a moderate scenario of climate
 606 changes (IPCC 2014). The species sampled belong to two different groups regarding
 607 their geographical distribution: endemics (*Favia gravida*, *Mussismilia harttii*,
 608 *Mussismilia hispida* and *Siderastrea stellata*; and amphi-Atlantics (*Montastraea*
 609 *cavernosa*, *Porites astreoides*, *Porites branneri*, and *Millepora alcicornis*). The
 610 horizontal line inside each box indicates the median CS activity, whereas the box
 611 boundaries represent the interquartile values. Whiskers illustrate the minimum and
 612 maximum enzyme activities (Control *Porites branneri* 0.0005- Treatment *S. stellata*
 613 0.092).

614

615



616

617 **Figure 3.** Citrate synthase activity on control condition (26 °C and pH 8.1) mapped onto
 618 coral phylogeny modified from Kitahara et al. (2016), maintaining only the species here
 619 evaluated biochemically. *Millepora alcicornis* is used as outgroup. The species sampled
 620 belong to two different groups regarding their geographical distribution: endemics from
 621 Southwestern Atlantic reefs (*Favia gravida*, *Mussismilia harttii*, *Mussismilia hispida*
 622 and *Siderastrea stellata*; and amphi-Atlantics (*Montastraea cavernosa*, *Porites*
 623 *astreoides*, *Porites branneri* and *Millepora alcicornis*).

624

625

626

627

628

629

630

631 Captions of the tables

632 **Table 1.** Optimum concentrations of the substrates Acetyl Coenzyme A
633 (ACoA) and oxaloacetate of citrate synthase for each species in both
634 conditions (control and treatment).

Species	[ACoA], mM	[Oxaloacetate], mM
<i>Favia gravida</i>	1.3	4.5
<i>Millepora alcicornis</i>	0.5	4.5
<i>Montastraea cavernosa</i>	1.3	3.5
<i>Mussismilia hispida</i>	2.3	2.5
<i>Porites astreoides</i>	1.3	4.5
<i>Porites branneri</i>	2.3	2.5
<i>Siderastrea stelatta</i>	1.3	4.5

643 **Table 2.** Summary of the Analysis of Variance (one-way ANOVA) to evaluate the
644 effect of simulated climate changes (combination of temperature increase with pH
645 reduction) on citrate synthase activity. **p<0.001 ***p<0.

Species	Sum Sq	Df	F value	P(>F)
<i>Favia gravida</i>	0.000618	1	0.0161	0.90
<i>Millepora alcicornis</i>	9.245	1	152.41	0.05***
<i>Montastraea cavernosa</i>	0.00353	1	0.1125	0.74
<i>Mussismilia harttii</i>	0.055115	1	1.0573	0.34
<i>Mussismilia hispida</i>	0.933	1	21.656	0.05**
<i>Porites astreoides</i>	0.38645	1	1.5783	0.25
<i>Porites branneri</i>	11.4849	1	39.057	0.05***
<i>Siderastrea stellata</i>	0.2425	1	0.5591	0.48

APÊNDICE 2

Este apêndice apresenta os gráficos de padronização da atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em unidades enzimáticas (U) por mg de proteína (U mg^{-1}) em diferentes concentrações dos substratos da enzima (Acetil Coenzima A - ACoA e oxaloacetato) para cada uma das espécies avaliadas nas duas condições experimentais (controle e tratamento).

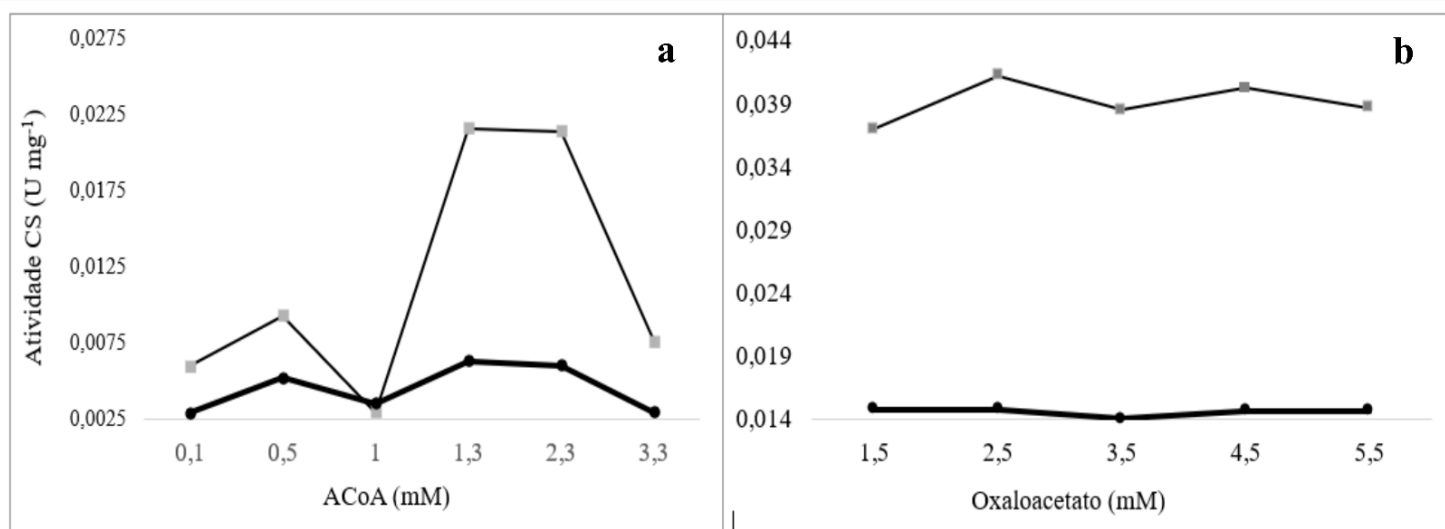


Figura 3. Atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em U mg⁻¹ na padronização dos substratos para a espécie *Favia gravida* (a) Atividade da CS em seis concentrações (0.1, 0.5, 1, 1.3, 2.3 e 3.3 mM) do substrato Acetil CoA (ACoA). (b) Atividade da CS em cinco concentrações (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 e 5.5) do substrato oxaloacetato. Legenda: (●) Representa as amostras da condição controle e (□) representa amostras do tratamento de mudanças climáticas (+ 2.5°C e – 0.3 unidades pH).

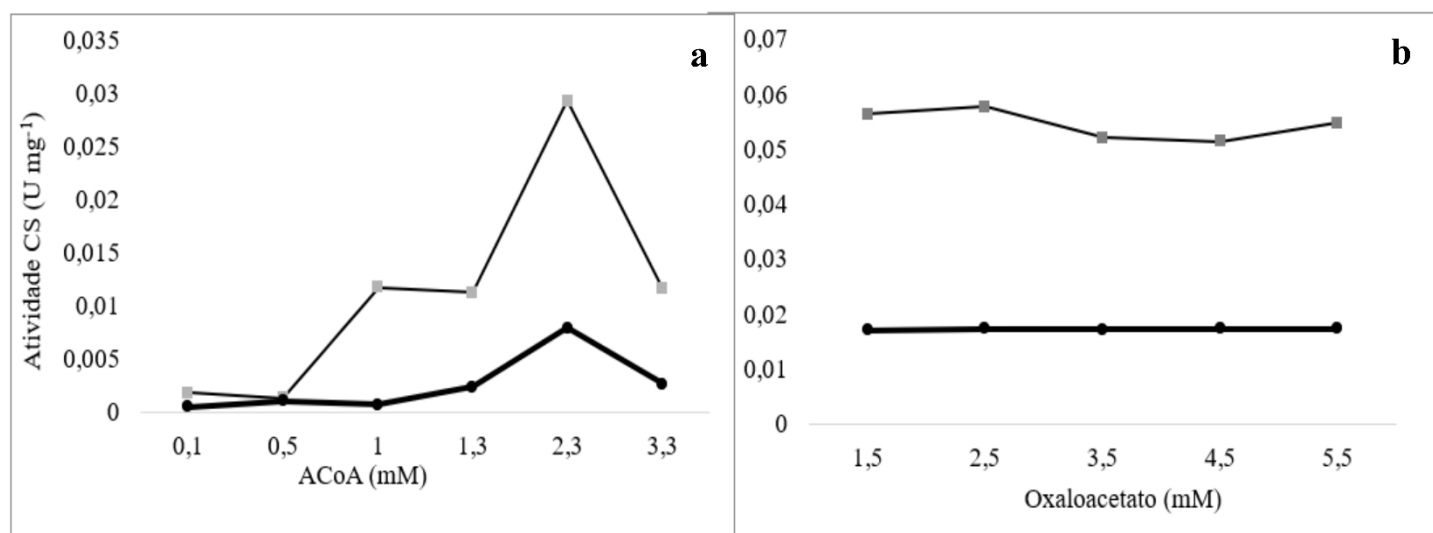


Figura 6. Atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em U mg⁻¹ na padronização dos substratos para a espécie *Mussismilia hispida* (a) Atividade da CS em seis concentrações (0.1, 0.5, 1, 1.3, 2.3 e 3.3 mM) do substrato Acetil CoA (ACoA). (b) Atividade da CS em cinco concentrações (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 e 5.5) do substrato oxaloacetato. Legenda: (●) Representa as amostras da condição controle e (□) representa amostras do tratamento de mudanças climáticas (+ 2.5°C e - 0.3 unidades pH).

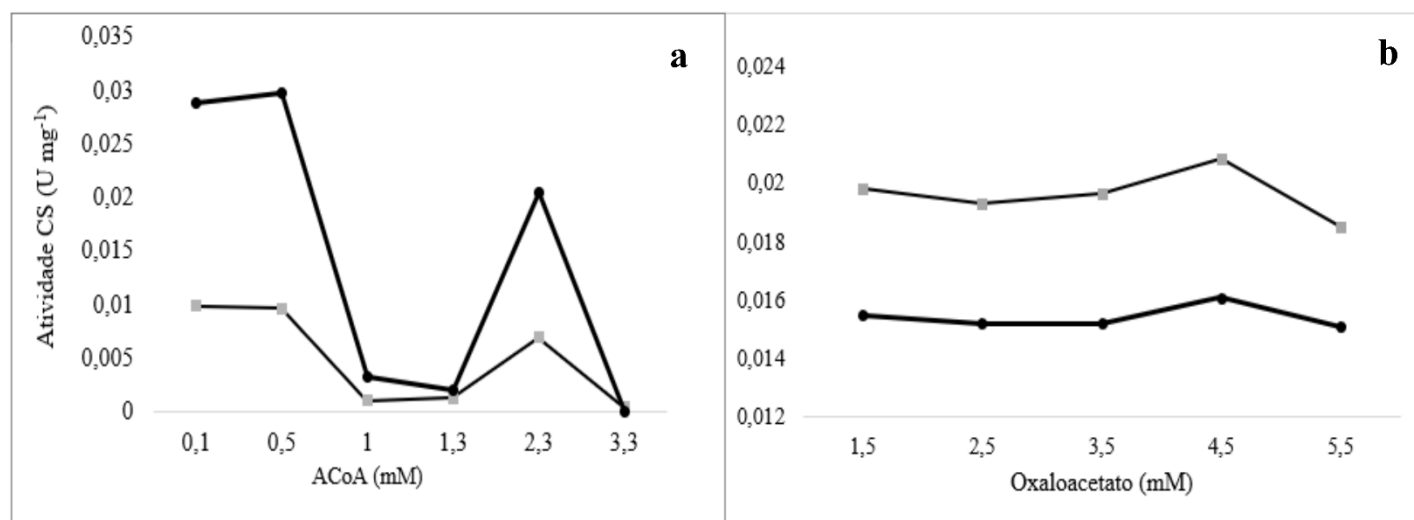


Figura 7. Atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em U mg⁻¹ na padronização dos substratos para a espécie *Millepora alcicornis* (a) Atividade da CS em seis concentrações (0.1, 0.5, 1, 1.3, 2.3 e 3.3 mM) do substrato Acetil CoA (ACoA). (b) Atividade da CS em cinco concentrações (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 e 5.5) do substrato oxaloacetato. Legenda: (●) Representa as amostras da condição controle e (□) representa amostras do tratamento de mudanças climáticas (+ 2.5°C e - 0.3 unidades pH).

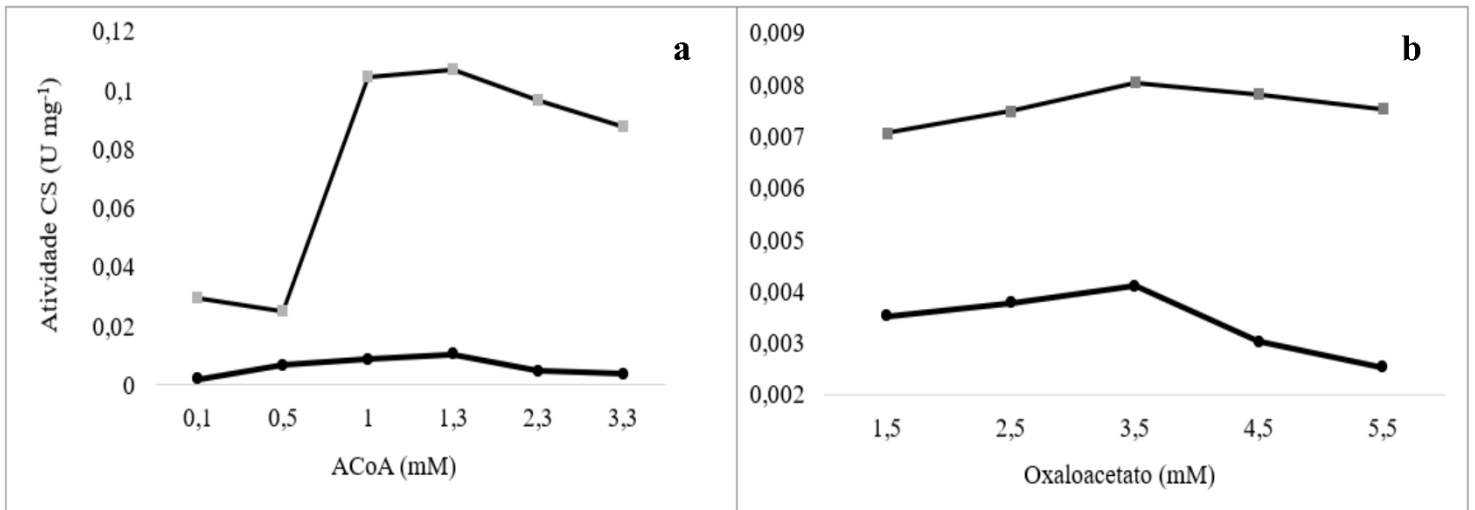


Figura 8. Atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em U mg⁻¹ na padronização dos substratos para a espécie *Montastraea cavernosa* (a) Atividade da CS em seis concentrações (0.1, 0.5, 1, 1.3, 2.3 e 3.3 mM) do substrato Acetil CoA (ACoA). (b) Atividade da CS em cinco concentrações (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 e 5.5) do substrato oxaloacetato. Legenda: (●) Representa as amostras da condição controle e (□) representa amostras do tratamento de mudanças climáticas (+ 2.5°C e - 0.3 unidades pH).

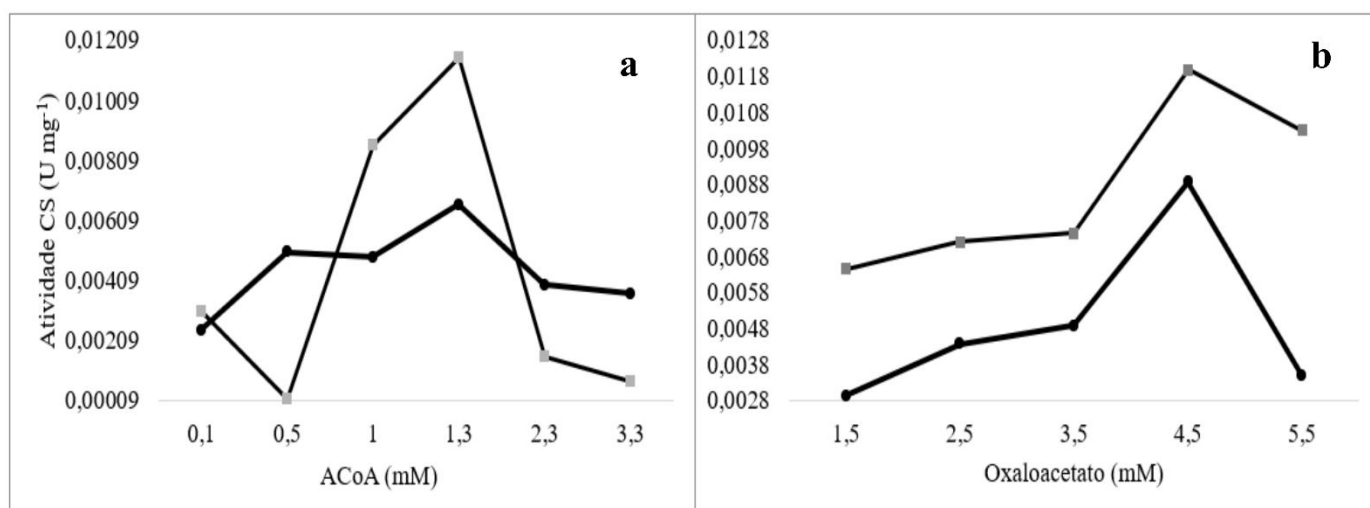


Figura 9. Atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em U mg⁻¹ na padronização dos substratos para a espécie *Porites astreoides* (a) Atividade da CS em seis concentrações (0.1, 0.5, 1, 1.3, 2.3 e 3.3 mM) do substrato Acetil CoA (ACoA). (b) Atividade da CS em cinco concentrações (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 e 5.5) do substrato oxaloacetato. Legenda: (●) Representa as amostras da condição controle e (□) representa amostras do tratamento de mudanças climáticas (+ 2.5°C e - 0.3 unidades pH).

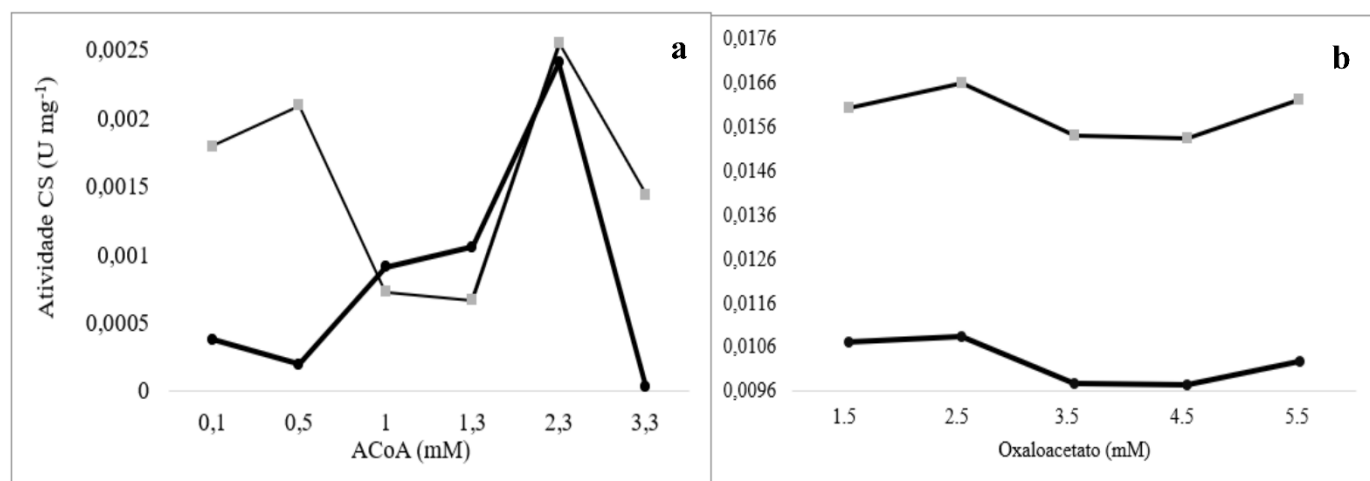


Figura 10. Atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em U mg⁻¹ na padronização dos substratos para a espécie *Porites branneri* (a) Atividade da CS em seis concentrações (0.1, 0.5, 1, 1.3, 2.3 e 3.3 mM) do substrato Acetil CoA (ACoA). (b) Atividade da CS em cinco concentrações (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 e 5.5) do substrato oxaloacetato. Legenda: (●) Representa as amostras da condição controle e (□) representa amostras do tratamento de mudanças climáticas (+ 2.5°C e - 0.3 unidades pH).

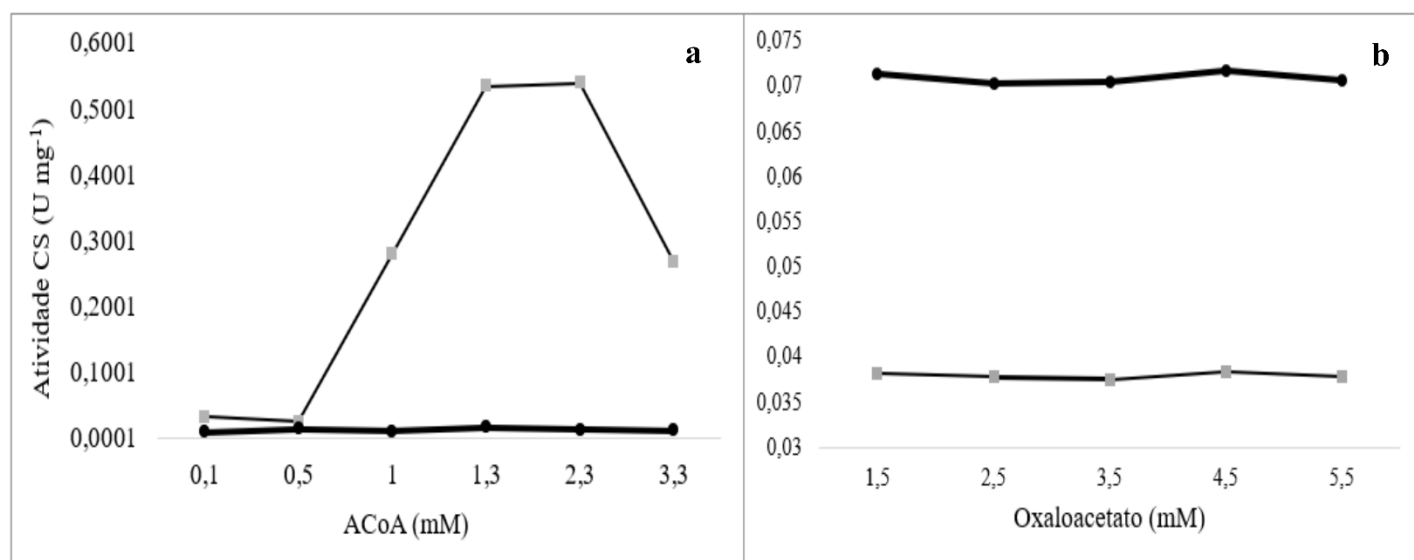


Figura 11. Atividade enzimática da Citrato Sintase (CS) em U mg⁻¹ na padronização dos substratos para a espécie *Siderastrea stellata* (a) Atividade da CS em seis concentrações (0.1, 0.5, 1, 1.3, 2.3 e 3.3 mM) do substrato Acetil CoA (ACoA). (b) Atividade da CS em cinco concentrações (1.5, 2.5, 3.5, 4.5 e 5.5) do substrato oxaloacetato. Legenda: (●) Representa as amostras da condição controle e (□) representa amostras do tratamento de mudanças climáticas (+ 2.5°C e - 0.3 unidades pH).