

WANDERSON VALENTE DOS SANTOS

Programa de Bolsas para Pesquisa de Campo de Mestrado e Doutorado
Chamada 02/2019 para Seleção de Bolsistas

Título do projeto:

AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS GAMETAS COMO FERRAMENTA
TECNOLÓGICA PARA COMPREENSÃO DA REPRODUÇÃO E SUBSÍDIOS PARA
CONSERVAÇÃO DO CORAL-CÉREBRO *Mussismilia harttii* (Verrill, 1868).

Tipo de bolsa solicitada: Mestrado

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Programa: Pós-Graduação em Zootecnia

Ingresso: Abril de 2019

ALUNO: WANDERSON VALENTE DOS SANTOS

Titulação: Licenciado em Ciências Biológicas

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5765820207485333>

ORIENTADOR DO PROJETO: LEANDRO CESAR DE GODOY

Titulação: Zootecnista, Mestre em Aquicultura, Doutor em Zootecnia

Cargo: Professor Adjunto A

Tipo de vínculo com a IES: 40 H, Dedicção exclusiva

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0814947894209025>

Eixo temático da pesquisa: Mudanças climáticas e conservação da biodiversidade

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os recifes de coral estão entre os ecossistemas de maior biodiversidade e produtividade do planeta. Ainda que ocupe uma área inferior a 1% de todo o oceano, estima-se que pelo menos um quarto de toda a vida marinha depende diretamente deste ambiente para sobrevivência (Mulhall, 2007; Wilkinson, 2008). Portanto, os recifes de coral exercem um importante papel na renovação dos estoques pesqueiros, gerando alimento e fonte de renda para milhares de comunidades em todo o mundo. Além disso, os corais têm grande potencial farmacológico e servem como barreiras de proteção para as regiões costeiras (Guldberg, 2007). Os corais são eucariontes e possuem uma estreita relação simbiótica com organismos unicelulares chamados de zooxantelas (Rohwer et al. 2002). As zooxantelas vivem dentro de células específicas (simbiossoma) onde estão protegidas e recebem suprimentos e nutrientes fundamentais para a realização da fotossíntese (Costa et al. 2005; Cairns, 2007). Em contrapartida, elas fornecem ao seu hospedeiro substratos provenientes da fotossíntese como oxigênio, glicose, glicerol e aminoácidos que são utilizados pelos corais.

Os corais apresentam um ciclo de vida simples que compreende duas fases: a fase larval (vida livre) e a de pólipos, que se fixa ao substrato (Ventura e Pires, 2009), e sua reprodução pode ocorrer de forma assexuada ou sexuada. A forma mais comum de reprodução assexuada ocorre através do brotamento de um pólipos que se desprende do pólipos parental ou através da fragmentação da colônia (Highsmith, 1982). Esse processo continua durante toda a vida do animal, sendo que os novos corais são clones da colônia parental.

A reprodução sexuada consiste na produção de gametas (espermatozoides e oócitos), promovendo a diversidade genética por meio da fecundação cruzada entre indivíduos (Harrison, 2011). Os corais podem desenvolver colônias ou pólipos de um único sexo (masculino ou feminino), ou hermafroditas. Nesta última situação, o animal desenvolve ambos os sexos, podendo ocorrer colônias de pólipos hermafroditas, ou colônias de pólipos machos e fêmeas. (Pires et al., 2016). Os gametas masculinos e femininos são formados no mesmo pólipos, dentro de regiões do mesentério. Desse modo, quando maduros, a parede do mesentério se rompe, liberando oócitos e espermatozoides para o interior da cavidade gastrovascular, onde são envoltos por uma camada de muco formando um pacote compacto.

No período da desova os pacotes com os gametas são liberados pelas bocas dos pólipos. Quando eliminados na água, os pacotes boiam até atingir a superfície do mar. Na superfície eles se rompem e os espermatozoides e oócitos se dissociam uns dos outros. A fecundação cruzada, onde o oócito de uma colônia é fecundado pelo espermatozoide de outra colônia ocorre livremente na água, formando embriões que ficam à deriva no mar. Em poucos dias esses embriões se desenvolvem em larvas. Essas larvas se fixam ao substrato, sofrem metamorfose, tornando-se pólipos juvenis, que irão começar a

produzir em sua base o esqueleto de calcário. Esses pólipos juvenis então se multiplicam de forma assexuada por divisão, e assim se dá o crescimento das colônias (Pires et al. 2016).

Atualmente, o ecossistema recifal vem sofrendo grande ameaça decorrente dos impactos provocados pelo homem, como o lançamento de resíduos urbanos e industriais nos corpos d'água, a superexploração dos recursos pesqueiros, a acidificação das águas e o uso de substâncias químicas nocivas presentes em protetores solares, além da mudança do clima do planeta (Baker et al., 2008). O estresse térmico provocado pelo aumento da temperatura do oceano (NOAA, 2016) faz com que a simbiose entre as microalgas (zooxantelas) e os corais se desfça, levando ao desenvolvimento de um fenômeno chamado branqueamento. Dependendo da intensidade do branqueamento, os corais não conseguem se recuperar e acabam morrendo. Dados de monitoramento no ano de 2016 mostraram que a mortalidade média foi de 22% para toda Grande Barreira de Corais na Austrália (AIMS, 2016; Hughes et al., 2016). Estima-se que cerca de 40% dos recifes de coral do planeta já morreram, e as previsões apontam que esses eventos se tornarão ainda mais frequentes, limitando sua recuperação e podendo levar ao colapso de todo esse ecossistema (Godoy, 2018).

O Oceano Atlântico Sul abriga 16 espécies de corais pétreos (verdadeiros) de águas rasas, sendo cinco delas endêmicas do Brasil (Castro e Zilberberg, 2016). O coral-cérebro (*Mussismilia harttii*) está entre as principais espécies responsáveis pela construção dos recifes brasileiros, porém já está sofrendo com eventos de branqueamento e doenças (Castro e Pires, 1999; Leão et al., 2016) e encontra-se sob ameaça de extinção (IBAMA, 2018). Anomalias térmicas potencializadas pelo El Niño ocorreram no primeiro semestre desse ano (2019) e causaram o branqueamento de cerca de 80% das colônias de *M. harttii* no Parque Marinho do Recife de Fora (Porto Seguro, BA), sendo que a extensão desse dano ainda é desconhecida.

A preservação *in situ*, como unidades de conservação marinha, pode colaborar na redução dos impactos locais, mas a influência antrópica na mudança do clima ainda continuará provocando o decréscimo da biodiversidade do ecossistema coralíneo. Com o desaparecimento dos corais, a diminuição drástica dessa biodiversidade afetará a pesca e poderá deixar 275 milhões de pessoas em situação de fome extrema (FAO, 2018), acarretando em um prejuízo econômico de quase US\$ 7 bilhões de dólares (Bruno e Valdivia, 2016). Somado a isso, têm os impactos ecossistêmicos recorrentes do avanço de tempestades vindas diretamente do mar aberto, e eventos de erosão e sedimentação nas regiões costeiras.

Algumas técnicas seguras para preservar a existência dos corais estão relacionadas ao conhecimento básico da biologia dos seus gametas (espermatozoides e oócitos) e de como ocorre a fertilização. Conhecer os gametas em nível ultra estrutural dá subsídios para sua manipulação adequada a fim de garantir o sucesso em técnicas de reprodução *in vitro* e de estocagem em baixa temperatura

(criopreservação) (Hagedorn et al., 2006; 2012; 2018; Ohki et al., 2014). Estudos detalhados sobre a ultraestrutura dos gametas de corais se limitam à poucos relatos na literatura. Alguns trabalhos avaliaram a ultraestrutura para identificar os processos de gametogênese em duas espécies (*Pocillopora darnicornis* e *Pocillopora elegans*) do Pacífico - Oriental (Glynn et al., 1991) e comparação filogenética em 35 espécies de Anthozoários do Oceano Atlântico – Mediterrâneo (Schmidt et al. 1979). Nosso grupo de pesquisa (Projeto ReefBank) tem desenvolvido diversos estudos voltados à conservação do coral *M. harttii*, no entanto, nos deparamos com uma lacuna no conhecimento básico acerca da biologia dos seus gametas. A avaliação ultra estrutural nunca foi realizada para qualquer espécie de coral brasileiro.

Essa proposta traz uma abordagem inédita no Brasil. O conhecimento ultra estrutural permitirá entender como ocorre a fecundação e quais as estruturas responsáveis pela viabilidade dos gametas, gerando assim um conhecimento básico, sólido e crucial que servirá de referência para o estabelecimento de estudos de reprodução *in vitro*, fisiologia e congelamento de gametas. A associação desses conhecimentos somará esforços para a conservação dessa espécie endêmica da nossa costa.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Caracterizar a ultraestrutura dos gametas do coral-cérebro (*Mussismilia harttii*) e dar subsídios para o estabelecimento de técnicas para conservação da espécie.

Objetivos específicos:

- Caracterizar a ultraestrutura dos espermatozoides de *M. harttii* utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Caracterizar a ultraestrutura dos oócitos de *M. harttii* utilizando MEV e MET;
- Identificar as estruturas transmembrana nos oócitos de *M. harttii*;
- Identificar e localizar as organelas presentes nos oócitos e espermatozoides de *M. harttii*;
- Realizar um comparativo entre gametas de diferentes invertebrados marinhos.

3. METODOLOGIA A SER UTILIZADA E ATIVIDADES PREVISTAS

3.1 Local e autorizações legais

Os experimentos serão realizados na Base de Pesquisas do Projeto Coral Vivo, localizada em Arraial D'Ajuda, Porto Seguro (BA).

Vinte colônias do coral *Mussismilia harttii* serão coletadas no entorno do Parque Municipal Marinho do Recife de Fora (16°24'31"S; 038°58'39"W) cerca de três semanas antes do período de desova, e levadas para a Base de Pesquisa. Essas colônias serão identificadas e acondicionadas em viveiros (1000 L) de circulação aberta, com renovação constante de água captada do mar.

A execução dessa pesquisa foi aprovada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (SISBIO N° 63368-1) e pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente da Prefeitura de Porto Seguro (Autorização N° 01/2019).

3.2 Coleta dos gametas

No momento da desova, os pacotes contendo oócitos e espermatozoides serão coletados na superfície da água dos viveiros diretamente em tubos cônicos de 50 ml. Três pacotes de cada colônia serão rapidamente coletados e aderidos à lamínulas redondas (18 mm) com auxílio da cola polilisina, secando em temperatura ambiente. Os demais pacotes (que permaneceram nos tubos) se romperão, ocorrendo a separação dos oócitos e espermatozoides. Os oócitos flutuam e ocupam a superfície do tubo, enquanto o sêmen permanece no fundo. Os oócitos serão coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, lavados para remover qualquer vestígio de sêmen e então presos às lamínulas redondas contendo cola polilisina. Alíquotas (± 1 ml) de sêmen contendo os espermatozoides também serão aderidas às lamínulas com cola polilisina. Serão coletadas três amostras (ambos os gametas) de cada colônia que desovar. Posteriormente, todas as amostras serão transferidas para a solução de fixação.

3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os gametas e pacotes serão fixados em solução contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% e solução tampão preparada com água marinha (pH 7,5-7,8), permanecendo nessa solução até o momento das análises. O material pré-fixado passará por lavagens de três banhos (30 minutos) com solução tampão de água marinha. A pós-fixação será realizada em tetróxido de ósmio 2% + solução tampão (30-45 minutos) e em seguida realizados 3 banhos no mesmo tampão (15 minutos). A desidratação será realizada em séries crescentes de acetona PA (30% a 100%) por 10 minutos e a pré-embebição realizada em banhos, misturando o desidratante com a resina em proporções gradativas crescentes de resina, com tempo mínimo de 2 horas em cada banho. A embebição será realizada com

banhos de resina (100%) durante 24 horas em rotetor. A inclusão será realizada em moldes de silicone, com resina pura, em estufa (60°C) por 72 horas. Cortes ultra-finos serão depositados em grids e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo, e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Philips, MET 200).

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

O material biológico será fixado em solução tampão de água marinha (7,5-7,8) contendo glutaraldeído 2,5%, onde permanecerá até o momento das análises. O material pré-fixado passará por lavagens de três banhos (30 minutos) com solução tampão de água marinha. A desidratação será realizada em séries crescentes de acetona (30% a 100%) por 10 minutos. A dessecação do material ocorrerá em aparelho de Ponto Crítico (Critical Point Dryer - Balzers cpd030). Após o ponto crítico, as peças serão colocadas em Stub, com o auxílio de uma lupa, para facilitar a visualização do ponto crítico ou área de interesse. Para a metalização o material receberá a condução por meio de ouro e platina, utilizando Sputter Coater - Balzers SCD050 e levado para observação em Microscópio Eletrônico de Varredura (Fesem, MEV 6060).

3.5 Detalhamento das leituras, registro fotográfico e interpretação

Feixes de elétrons serão emitidos e ao atingir as amostras (pacotes, espermatozoides e oócitos), ocorrendo uma interação entre elas e gerando padrões excitatórios. Essa interação terá como consequência elétrons secundários e elétrons retroespalhados que serão absorvidos pelo detector de sinais. Além disso, esse processo desencadeará na ionização do átomo atingido pelos elétrons primários. Esse desequilíbrio de cargas causará a geração de raios X (radiação de desaceleração) no material.

Na microscopia eletrônica de transmissão, pelo fato de a amostra ser extremamente fina, os elétrons conseguem facilmente atravessa-la e interagir com ela, possibilitando gerar imagens mais detalhadas sobre a ultraestrutura do material analisado. Já a microscopia eletrônica de varredura, pelo fato de o material ser mais espesso, ocorre a desaceleração total do elétron, possibilitando a observação apenas da superfície da amostra. Os registros e as análises fotográficas serão realizados no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre.

4. DETALHAMENTO DA INFRAESTRUTURA FÍSICA E TECNOLÓGICA A SER UTILIZADA

- Base de Pesquisas do Projeto Coral Vivo:

O Projeto Coral Vivo (<http://coralvivo.org.br/>) por meio de sua Base de Pesquisas localizada em Arraial D'Ajuda (Porto Seguro – BA) dará o apoio logístico e de infraestrutura. A base conta com um mesocosmo marinho capaz de simular as condições do mar, viveiros de circulação aberta para manutenção das colônias de corais, data loggers para monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água, equipamentos de mergulho e de microscopia óptica.

- Laboratório de Aquacultura – UFRGS:

O Laboratório de Aquacultura da UFRGS conta com 150 m² equipados para realização de pesquisas com reprodução e larvicultura de organismos aquáticos. Dispõe de sala de microscopia equipada com dois (3) microscópios ópticos, um (1) microscópio de fluorescência (1), dois (2) estereomicroscópios e uma (1) câmera de captura de imagens. Possui uma sala para comportar o banco de germoplasma, contendo quatro (4) botijões de nitrogênio líquido e um botijão Dry shipper. Uma sala para manipulação de amostras biológicas contendo uma câmara de fluxo laminar e uma estufa para cultura celular com controle de CO₂. Possui ainda uma sala para permanência dos alunos com mesas de trabalho e 2 computadores desktop.

- Centro de Microscopia Eletrônica – UFRGS

O Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise oferece condições efetivas para o uso dos recursos da microscopia eletrônica e outras técnicas de caracterização micro e nano estrutural em atividades relacionadas ao ensino, pesquisa e extensão. Dispondo em sua unidade um laboratório para preparação de amostras com 1 ultramicrotomo com navalha de vidro, 1 ultramicrotomo com navalha de diamante, 1 crioultramicrotomo, 1 Sputtering com alvo de ouro para metalização de amostras, 1 ponto crítico e 1 Freeze-drying. Além de uma sala contendo quatro microscópios para análise de varredura sendo 1 EVO 50, 1 EVO MA10, 1 FEG – Auriga, 1 JSM 6060 e uma sala com três microscópios de transmissão contendo 1 JEM 1200 e 1 JEM 2010.

5. CRONOGRAMA A SER CUMPRIDO

ATIVIDADES PREVISTAS	2020			2021		
Reuniões mensais da equipe	■	■	■	■	■	■
Coleta das amostras no Recife de Fora	■					
Preparo das amostras: Microscopia Eletrônica de Transmissão	■					
Desidratação e inclusão das amostras	■					
Ultramicrotomia		■	■			
Contraste pós corte		■	■			
Registros e análise no microscópio eletrônico			■	■	■	
Preparo das amostras: Microscopia Eletrônica de Varredura				■	■	
Dessecação em ponto crítico				■	■	
Metalização				■	■	
Registros e análise no microscópio eletrônico				■	■	
Relatórios Parciais			■			■
Participação em eventos técnico/científicos	■					■
Redação de artigo científico			■	■	■	
Submissão de artigo científico				■	■	■
Treinamento e qualificação de recursos humanos	■	■	■	■	■	■
Interação com a sociedade via redes sociais do projeto	■	■	■	■	■	■
Relatório final						■

6. ORÇAMENTO COM ESTIMATIVA DOS GASTOS PREVISTOS

Orçamento da Pesquisa						
Categoria de despesa	Descrição dos itens	Material será cedido para Instituição (Sim ou Não)	Quantidade	Unidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Uso e consumo	Ponteira micropipeta s/ filtro 0,1-10 µl	Sim	8	Pct c/ 1000	56,45	451,6
	Ponteira micropipeta s/ filtro 1-200 µl	Sim	8	Pct c/ 1000	49,4	395,2
	Ponteira micropipeta s/filtro 1000-5000 µl	Sim	6	Pct c/ 100	39,81	238,85
	Estante dupla face p/ 96 microtubos 0,5-2 ml	Sim	8	1un	23,82	190,56
	Microtubo graduado 1,5 ml c/ tampa	Sim	10	Pct c/ 500	28,31	283,1
	Tubo tipo Falcon 15 ml fundo cônico	Sim	8	Pct c/ 100	50,34	402,72
	Tubo tipo Falcon 50 ml fundo cônico	Sim	15	Pct c/ 50	33,25	498,75
	Tubo criogênico 2 ml c/ tampa rosca externa	Sim	3	Pct c/ 500	60,32	180,96
	Pipeta Pasteur descartável 1 ml	Sim	1	Pct c/ 500	52	52
	Pipeta Pasteur descartável 3 ml	Sim	1	Pct c/ 500	35,25	35,25
	Luva de Látex p/ procedimento c/ talco	Sim	15	Cx c/ 100	33,53	502,95
	Lâmina lisa p/microscopia 26x76 mm	Sim	10	Cx c/ 50	10	100
	Lamínula p/ microscopia 18x18 mm	Sim	2	Cx c/ 1000	23,77	47,54
	Lamínula para microscopia redonda 18x18 mm	Sim	1	Cx c/ 100	62	62
	Glutaraldeído 1L	Sim	1	Litro	765	765

WANDERSON VALENTE DOS SANTOS

	Paraformaldeído 1L	Sim	1	Litro	500	500
	Sal marinho 1kg	Sim	1	Kg	23	30
	Acetona PA 1L	Sim	3	Litro	165	495
	Álcool absoluto 1L	Sim	2	Litro	112,8	225,6
	Resina Histológica – Histoiresina – 500 ml	Sim	1	ml	1.335,75	1.335,75
	Stub – porta amostra de alumínio	Sim	1	Cx c/ 100	406,04	406,45
Serviço de terceiros Pessoa Jurídica	Design gráfico, edição de imagens e vídeos	Não	1		2.800	2.800,00
	Preparo das amostras e análise na Microscopia Eletrônica (MEV e MET)	Não	22	Horas	250,00	5.500,00
Viagens	Hospedagem + Alimentação	Não	15	Diária	300	4.500,00
TOTAL						19.999,28

7. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO PREVISTO

Contribuição Tecnológica e de Inovação para Conservação da Natureza:

- Criar um banco de imagens com as principais ultraestruturas dos pacotes, espermatozoides e oócitos do coral-cérebro;
- Caracterização detalhada da ultraestrutura dos gametas, gerando conhecimento básico e inédito que dará suporte à protocolos de reprodução *in vitro* e conservação dos gametas do coral-cérebro.

Contribuição científica:

- Beneficiar a comunidade científica por meio da publicação de dois artigos científicos em periódicos de alto impacto nas áreas de Conservação, Recifes de Coral e Biologia Reprodutiva;
- Formação de recursos humanos, prezando pela capacitação e iniciação à ciência de alunos do ensino fundamental, médio e qualificação em nível de pós-graduação. Serão fruto desse projeto: uma dissertação de mestrado e um TCC.
- Divulgação dos resultados em importantes congressos científicos, promovendo *networking* e interação dos membros da equipe com a comunidade científica da área.

Impactos na sociedade:

- Aproximar da sociedade e falar de ciência ambiental e recifes de coral de uma forma simples e interativa.
- Divulgar as ações e resultados do projeto no seu perfil no Instagram (projetoreefbank_) que conta com mais de 17 mil seguidores, e na fanpage (Projeto ReefBank) no Facebook.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIMS. 2016. - The Australian Institute of Marine Science. The facts on Great Barrier Reef coral mortality, Latest releases 03 June 2016. Available at: http://www.aims.gov.au/documents/30301/2109302/GBRMPA+and+AIMS+media+release_The+facts+on+GBR+coral+bleaching-Final-2016.pdf/f31789c6-5b4b-4aee-bb1f-27560437c2b4
- Baker, A. C., Glynn, P. W., and Riegl, B. 2008. Climate change and coral reef bleaching: an ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 80, 435–471. doi:10.1016/J.ECSS.2008.09.003.
- Bruno, J. F., & Valdivia, A. (2016). Coral reef degradation is not correlated with local human population density. *Scientific Reports*, 6, 29778.
- Castro, C.B.; Zilberberg, C. 2016. Recifes brasileiros, sua importância e conservação. In: *Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo*. Eds. Zilberberg, C.; Abrantes, D.P.; Marques, J.A.; Machado, L.F.; Marangoni, L.F.B. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, 2016, 360 p.
- Castro, C.B.; Pires, D.O. 1999. A bleaching event on a Brazilian coral reef. *Revista Brasileira de Oceanografia* (47), 87-90.
- Cairns, S.D. 2007. Deep-water corals: an overview with special reference to diversity and distribution of deep-water scleractinian corals. *Bulletin of marine Science*, v. 81, n. 3, p. 311-322.
- Costa, C. F.; Sassi, R; Amaral, F. D. 2005. Annual coce of symbiotic dinoflagellates from three species of scleractinian corals from coastal reefs of northeastern Brazil. *Coral Reefs*, v. 24, n. 2, p. 191-193.
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Glynn, P.W.; Gassman, N.J.; Eakin, C.M.; Cortes J.; Smith, D.B.; Guzman, H.M. 1991. Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and Galapagos Islands (Ecuador). *I. Mar Biol* 109:355–368
- Godoy, L. 2018. Projeto ReefBank: usando biotecnologias a favor da conservação dos recifes de coral. *Aquaculture Brasil*, v. 15, p. 24-28.
- Guldberg H. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, v. 318, n. 5857, p. 1737-1742.

- Hagedorn, Mary M. et al. 2018. Cryopreservation of fish spermatogonial cells: the future of natural history collections. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 6149.
- Hagedorn, M.; Oppen, M.J.H.V.; Carter, V.; Henley, M.; Abrego, D.; Puill-Stephan, E.; Negri, A.; Heyward, A.; MacFarlane, D.; Spindler, R. 2012. First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. *Cryobiology* (65), 157-158.
- Hagedorn, M.; Carter, V.L.; Steyn, R.A.; Krupp, D.; Leong, J.C.; Lang, R.P.; Tiersch, T.R. 2006. Preliminary studies of sperm cryopreservation in the mushroom coral, *Fungia scutaria*. *Cryobiology* (52), 454-458.
- Harrison, Peter L. 2011. Sexual reproduction of scleractinian corals. In: Coral reefs: an ecosystem in transition. Springer, *Dordrecht*, p. 59-85.
- Hughes, T. 2016. Coral crisis: Great Barrier Reef bleaching is “the worst we’ve ever seen”. *Nature News*, April 13, 2016. Available at: <http://www.nature.com/news/coral-crisis-great-barrier-reef-bleaching-is-the-worst-we-ve-ever-seen-1.19747>.
- Imade, G.E.; Towobola, O.A.; Sagay, A.S.; Otubu, J.A.M. 1993. Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler and Horwells counting chambers. *Archives of Andrology* (31), 17-22.
- Leão, Z.M.A.N.; Kikuchi, R.K.P.; Ferreira, B.F.; Neves, E.G.; Sovierzoski, H.H.; Oliveira, M.D.M.; Maida, M.; Correia, M.D.; Johnsson, R. 2016. Brazilian coral reefs in a period of global change: a synthesis. *Brazilian Journal of Oceanography* (64), 97-116.
- LVFBAE - Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VII – Invertebrados --1.ed.--Brasília,DF:ICMBio/MMA,2018. 7 v.:il.
- Mulhall M. 2007. Saving rainforests of the sea: An analysis of international efforts to conserve coral reefs. *Duke Environmental Law and Policy Forum*, 19:321-351.
- NOAA - National Centers for Environmental Information, State of the Climate: Global Analysis for November 2016. Published online December 2016, retrieved on January 16, 2017 from <http://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/201611>.
- Ohki, S.; Motita, M.; Kitanobo, S.; Kowalska, A.A.; Kowalski, R.K. 2014. Cryopreservation of *Acropora digitifera* sperm with use of sucrose and methanol based solution. *Cryobiology* (69), 134-139.
- Pires, D.O.; Castro, C.B.; Segal, B.; Pereira, C.M.; Carmo, E.C.; Silva, R.G.; Caderon, E.N. 2016 Reprodução de corais de águas rasas do Brasil. In: Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, 2016, 360 p.

- Rohwer F. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, v. 243, p. 1-10.
- Schmidt, H.; Zissler, D. 1979. Die Spermien der Anthozoen und ihre phylogenetische Bedeutung. *Zoologica* 129: 1-98.
- Ventura, C.R.R.; Pires, D.O. 2009. Ciclos de Vida de Invertebrados Marinhos. p. 71-94 in Pereira, r.C.; soares-GoMes, A. (Orgs) *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro: Interciência.
- Wells, J. W. 1954. Recent corals of the Marshall Islands. Prof. Pap. U.S. Geol. Surv. 260: 385-486.
- Wilkinson C (ed). 2008. *Status of Coral Reefs of the World: 2008*. Townsville (Australia): Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest. *Research Center*, 296 pp.

