

NAYARA OLIVEIRA DA CRUZ

Programa de Bolsas de Mestrado e Doutorado
Chamada 2018 para Seleção de Bolsistas

Título do projeto:

REPRODUÇÃO *IN VITRO* E CONGELAMENTO DE GAMETAS COMO FERRAMENTAS TECNOLÓGICAS PARA CONSERVAÇÃO DO CORAL-CÉREBRO *Mussismilia harttii* (Verrill, 1868) E RECUPERAÇÃO DE RECIFES DEGRADADOS

Tipo de bolsa solicitada: Doutorado

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Programa: Pós-Graduação em Zootecnia

Ingresso: Abril de 2018

ALUNA: NAYARA OLIVEIRA DA CRUZ

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3361360444898434>

ORIENTADOR DO PROJETO: LEANDRO CESAR DE GODOY

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 mais diversos do planeta. Apesar da área total dos recifes de coral ser muito inferior a 1% de todo o ambiente marinho, algumas estimativas colocam a diversidade total de vida associada aos recifes de corais em até 2 milhões de espécies, perto de 25% de toda a vida marinha (Mulhall, 2007; Wilkinson, 2008). Portanto, os recifes de corais desempenham um papel fundamental na renovação dos estoques pesqueiros que sustentam milhares de comunidades humanas em todo o mundo. Além disso, facilitam a fixação de nitrogênio, a regulação do carbono e funcionam como barreiras naturais que protegem as áreas costeiras. Os corais são organismos eucarióticos chave que possuem relações intrincadas com um conjunto de micro-organismos, incluindo dinoflagelados endossimbióticos (zooxantelas), fungos, bactérias e archaea.

Nos últimos 20 anos, os impactos antrópicos locais e globais têm sido de grande preocupação, sendo este último particularmente preocupante devido ao cenário atual de eventos de mudanças climáticas (Hughes et al., 2003; Baker et al., 2008). O estresse térmico, causado pelo aumento da temperatura da superfície do oceano (NOAA, 2016) rompe a simbiose entre as microalgas (zooxantelas) que vivem no tecido dos corais e que dão ao coral seu alimento (glicose, glicerol, aminoácidos, etc.), tornando-os brancos – o chamado branqueamento. Dependendo da intensidade do estresse, os corais não se recuperam e morrem. Em 2016, a temperatura recorde dos oceanos levou a um branqueamento massivo nos recifes de corais australianos. Dados de monitoramentos subaquáticos mostraram que a mortalidade média foi de 22% para toda a Grande Barreira de Corais, chegando a 67% em algumas regiões (AIMS, 2016; Hughes et al., 2016). As previsões indicam que esses eventos se tornarão ainda mais frequentes (Heron et al., 2016), diminuindo a resiliência dos corais e ameaçando os ecossistemas recifais em todo o planeta.

Os únicos recifes de águas rasas verdadeiros do Oceano Atlântico Sul estão ao longo da costa brasileira e abrigam 16 espécies de corais pétreos, com cinco delas endêmicas do Brasil (Castro e Zilberberg, 2016). O coral-cérebro *Mussismilia harttii* está entre os principais construtores dos recifes brasileiros, já foi afetado por eventos de branqueamento e doenças (Castro e Pires, 1999; Leão et al., 2016) e encontra-se ameaçado de extinção (MMA, 2014).

Enquanto práticas de conservação *in situ* como as áreas marinhas protegidas podem ajudar a diminuir os impactos locais, os impactos antrópicos como o aquecimento global continuarão causando declínios populacionais em taxas ainda mais rápidas. Grandes mortalidades sem recuperação levam a uma diminuição na diversidade genética das populações de corais e a possibilidade de extinção de espécies é alta, uma vez que a persistência de uma população ou espécie é amplamente dependente da sua diversidade genética (Laikre et al., 2010).

Uma maneira segura de conservar a existência de corais é através da preservação de seus gametas (espermatozoide e oócito) em baixas temperaturas (criopreservação), permitindo o uso futuro dessas células para a formação de novos corais. Embora seja um método comprovado para manutenção de células a longo prazo (Mazur, 1984) e conservação de espécies (Rawson et al., 2011), estudos sobre criopreservação de gametas de coral são recentes e limitados a poucos relatos na literatura. Os espermatozoides de três espécies de corais australianos (*Acropora tenuis*, *Acropora millepora* e *Acropora digitifera*) e um caribenho (*Fungia scutaria*) foram congelados com sucesso (Hagedorn et al., 2006; 2012; Ohki et al., 2014), sendo eficientes na fecundação dos oócitos e gerando larvas saudáveis capazes de assentar e se desenvolver (Hagedorn et al. 2017).

Esse projeto traz uma proposta inédita de pesquisa no Brasil, buscando aplicar ferramentas tecnológicas em prol da conservação do coral *M. harttii*. O estabelecimento dessas tecnologias permitirá a criação do primeiro banco de gametas de corais do Atlântico Sul, permitindo a estocagem desses gametas por tempo indeterminado, sendo descongelados quando desejado, promovendo a fecundação e o crescimento de novos recrutas de corais, que poderão ser utilizados na restauração de recifes degradados.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Usar a reprodução *in vitro* e o congelamento como tecnologias para alcançar sucesso no armazenamento dos gametas do coral-cérebro por tempo indeterminado, dando origem a corais que poderão ser utilizados na recuperação de recifes degradados.

Objetivos específicos:

- Caracterizar a estrutura morfológica dos gametas de *M. harttii*;
 - Avaliar a sensibilidade dos gametas ao resfriamento;
 - Avaliar a toxicidade dos agentes crioprotetores aos gametas de *M. harttii*,
 - Desenvolver um protocolo de congelamento para os gametas de *M. harttii*;
 - Avaliar a viabilidade dos gametas pós-descongelamento;
 - Estabelecer um protocolo para reprodução *in vitro* de *M. harttii*;
 - Avaliar o desenvolvimento de larvas e recrutas oriundos de gametas congelados;
 - Criar o primeiro banco de gametas de coral do Atlântico Sul utilizando como modelo a espécie *M. harttii*.
- Se aproximar da sociedade e falar de ciência ambiental e recifes de corais de uma forma simples e interativa por meio das redes sociais do projeto (Projeto ReefBank).

3. METODOLOGIA A SER UTILIZADA E ATIVIDADES PREVISTAS

3.1 Local e autorizações legais

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

Trinta colônias de *Mussismilia harttii* serão coletadas nos arredores do Parque Natural Municipal do Recife de Fora (16°24'31"S; 038°58'39"W) e transportadas até a Base de Pesquisa. As colônias serão identificadas e mantidas durante todo o período de desova em viveiros (1000 L) de circulação aberta, com renovação constante da água captada do mar.

A execução dessa pesquisa foi autorizada 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° 02/2017).

3.2 Coleta dos gametas

No momento da liberação, os pacotes de oócitos + espermatozoides serão coletados da superfície da água dos viveiros com auxílio de uma pipeta e transferidos para tubos cônicos de 50 mL. Nesses tubos com os pacotes separados, os oócitos flutuantes ocuparão o topo enquanto o sêmen estará concentrado no fundo do tubo. Ambos os gametas serão então separados e transferidos para outros tubos contendo água marinha filtrada (0,2 µm), onde permanecerão até o momento das análises.

3.3 Caracterização dos gametas

A taxa de motilidade espermática será determinada colocando uma alíquota de 10 µL do concentrado de espermatozoides sobre lâmina de vidro, adicionando uma lamínula e visualizando a amostra em um microscópio óptico (magnificação 40x). A taxa será expressa por quatro escores arbitrários (Gwo *et al.*, 2002), com 0 representando ausência de motilidade espermática e os escores 1-4 representando >0-25, >25-50, >50-75, >75%, respectivamente. As células móveis serão identificadas como aquelas que nadam progressivamente e deslocam o líquido. Essa avaliação será repetida com duas alíquotas (10 µL) adicionais, totalizando três avaliações para cada tubo.

A integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides será avaliada por coloração vital utilizando solução de eosina (5%) e nigrosina (10%) (Blom, 1950). Em uma lâmina histológica serão colocados separadamente o sêmen, eosina e nigrosina na razão de 1:2:4. O sêmen será misturado aos corantes e realizado um esfregaço. O esfregaço será seco sobre uma chama e a leitura realizada em microscópio óptico, em objetiva de imersão. Os espermatozoides corados em vermelho serão considerados não viáveis, enquanto aqueles não corados serão considerados como viáveis, ou seja, com membrana íntegra, impermeável aos corantes. A integridade da membrana espermática será calculada como porcentagem de espermatozoides não corados em um total de duzentos espermatozoides contados, sendo analisados três esfregaços de cada amostra coletada.

A concentração espermática será determinada utilizando a metodologia padrão de contagem em câmara hematómica de Neubauer (Imade *et al.*, 1993), com amostras de sêmen (triplicata) previamente fixadas em solução de formol-salina tamponada.

Para avaliar a morfologia do espermatozoide, uma alíquota de 10 µL de sêmen fixado será colocada sobre uma lâmina de vidro, coberta com uma lamínula e visualizada sob campo de contraste de fase em microscópio óptico equipado com sistema de captura de imagens (magnificação 100x). As imagens digitais serão capturadas e o diâmetro da cabeça e comprimento do flagelo dos espermatozoides serão medidos usando o software Image J. A morfologia celular será avaliada com base nas características descritas por Hagedorn *et al.* (2006) e o padrão de movimento (natação) do espermatozoide será caracterizado a partir dos vídeos registrados durante a análise de motilidade.

A integridade da membrana dos oócitos será avaliada utilizando coloração vital com azul de tripan (TB). Para realizar o ensaio, uma solução estoque de TB (0,4%) será diluída para 0,2% em água do mar filtrada (AMF). Os oócitos serão incubados por 2 min em temperatura ambiente e, em seguida, lavados três vezes com AMF. Os oócitos não corados serão considerados com membrana intacta, enquanto os corados em azul serão considerados com membrana lesionada. Essa avaliação será realizada sob microscopia de luz. Cinco alíquotas de oócitos (≈ 20) de cada colônia serão fixadas em solução de formol-salina tamponada e posteriormente avaliadas sob campo de contraste de fase em microscópio óptico equipado com sistema de captura de imagens. As imagens serão capturadas e o diâmetro dos oócitos será medido usando o software Image J.

Essa caracterização será crucial na definição de um padrão de qualidade dos gametas de *M. hartii*, que servirá como guia comparativo para todos os experimentos subsequentes.

3.4 Avaliação da sensibilidade dos gametas ao resfriamento

Para determinar a sensibilidade dos espermatozoides ao resfriamento, o sêmen de *M. hartii* será estocado sob refrigeração (5 °C) por uma semana. As amostras de sêmen serão distribuídas ao acaso em três meios diluidores: água marinha filtrada (AMF), AMF+5% glicose, AMF+5% citrato de sódio. A unidade experimental será caracterizada por um microtubo de 1,5 mL contendo 500 µL de solução (sêmen + diluidor), com 20 réplicas por tratamento. A viabilidade das amostras será analisada em intervalos de 12 horas, sendo expostas à temperatura ambiente por 5 min e em seguida avaliadas quanto a motilidade, integridade da membrana espermática e morfologia dos espermatozoides, conforme descrito no item 3.3.

A sensibilidade dos oócitos ao resfriamento será avaliada ao longo de uma semana utilizando refrigeração (5 °C). As amostras de oócitos serão distribuídas ao acaso em cinco meios de resfriamento: água marinha filtrada (AMF), AMF+5% sacarose, AMF+10% sacarose, AMF+5% glicose e AMF+10% glicose. Os oócitos serão acondicionados em placas de cultura de 6 poços (≈ 20

oócitos/poço), com 20 réplicas por tratamento. A viabilidade dos oócitos será analisada em intervalos de 12 horas, sendo expostos à temperatura ambiente por 5 min e em seguida avaliados quanto a integridade da membrana, conforme descrito no item 3.3.

3.5 Avaliação da toxicidade dos agentes crioprotetores

Os agentes crioprotetores (CPAs) a serem testados foram selecionados com base no seu uso na criopreservação de gametas de outros invertebrados marinhos (Paredes, 2015; Gwo, 2000). Serão testadas soluções de metanol (MET), propilenoglicol (PG), dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG) e dimetilacetamida (DMA) com concentrações variando de 0,5 a 5 M. As soluções crioprotetoras serão originalmente preparadas em dupla concentração (vol / vol) e diluídas 1:1 com a suspensão de gametas (espermatozoides ou oócitos) em água de mar filtrada para atingir a concentração final a ser testada. A unidade experimental será caracterizada por um microtubo de 1,5 mL contendo 500 µL de solução (sêmen + crioprotetor), com cinco réplicas por tratamento. Já os oócitos serão acondicionados em placas de cultura de 6 poços (\approx 20 oócitos/poço) e imersos na solução crioprotetora. Será utilizado um tratamento controle contendo apenas os gametas, sem adição de crioprotetores.

Os gametas serão incubados nas soluções crioprotetoras por 20 min em temperatura ambiente. Após esse período, a viabilidade será avaliada por meio da motilidade, integridade de membrana e morfologia das células, conforme descrito no item 3.3. As soluções crioprotetoras que apresentarem os melhores resultados nesses testes serão selecionadas para o protocolo de congelamento.

3.6 Protocolo para congelamento dos gametas

Os gametas serão previamente avaliados para quantificar a taxa inicial de motilidade, integridade de membrana e morfologia celular. A unidade experimental será caracterizada por um criotubo de 2 mL contendo a solução de congelamento (gameta + crioprotetor). Serão utilizadas 15 réplicas por tratamento. As amostras serão equilibradas em temperatura ambiente durante 20 min e em seguida submetidas à duas técnicas de criopreservação:

Congelamento lento: Será utilizada uma caixa de isopor preenchida parcialmente com nitrogênio líquido, equipada com uma grade metálica instalada 1 cm acima do nível do nitrogênio líquido. Os criotubos serão colocados sobre a grade metálica, permanecendo expostos ao vapor do nitrogênio líquido por cerca de 7 min, atingindo uma temperatura de transição entre -70 e -80 °C. Em seguida serão mergulhados no nitrogênio líquido, onde permanecerão por pelo menos 30 min, sendo então transferidos para o botijão de estocagem onde permanecerão até o momento das análises. Para o descongelamento, os criotubos serão retirados do nitrogênio líquido e expostos à um banho-maria (30 °C) por 1 min.

Vitrificação / Congelamento ultrarrápido: Nessa técnica, após o período de equilíbrio os criotubos serão imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido (sem exposição prévia ao vapor), e

permanecerão estocados até o momento das análises. As amostras serão aquecidas em banho-maria (70 °C) por 30 segundos.

3.7 Avaliação da viabilidade dos gametas pós-descongelamento

A viabilidade dos gametas pós-descongelamento será avaliada pelas características morfológicas (descritas no item 3.3) e levará em consideração também o *status* fisiológico dos gametas, empregando testes com sondas fluorescentes:

Integridade funcional da membrana: Para esse teste será utilizada a coloração dupla de Diacetato de Fluoresceína (FDA) + Iodeto de Propidium (PI). Uma solução estoque de FDA será preparada dissolvendo 5 mg/mL em acetona. A solução FDA de trabalho será preparada no momento do teste, adicionando 0,04 mL da solução estoque em 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS). A solução de PI será preparada dissolvendo 1 mg em 50 mL de PBS. Para a coloração, 0,1 mL (2 mg) da solução de trabalho de FDA e 0,03 mL (0,6 mg) da solução estoque serão adicionados diretamente aos gametas. Os gametas serão mantidos no escuro por 3 minutos e a avaliação da viabilidade será conduzida utilizando microscópio de fluorescência (Tsai *et al.*, 2009). Os gametas corados em verde brilhante serão considerados viáveis, ao passo que os não viáveis serão corados em vermelho brilhante. A coloração FDA + PI informa ao mesmo tempo o estado fisiológico e a integridade de membrana, visto que o FDA requer atividade de esterase celular além de uma membrana intacta, e o PI é conhecido por passar apenas através das membranas das células mortas ou danificadas (Wallace e Selman, 1981; Jones e Senft, 1985).

Integridade mitocondrial: As mitocôndrias são organelas muito sensíveis a exposição à baixa temperatura. Para avaliar a distribuição e atividade mitocondrial nos espermatozoides e oócitos após a criopreservação será utilizado o JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide), uma sonda sensível ao potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$). JC-1 forma monômeros fluorescentes verdes (despolarizados) ou agregados fluorescentes vermelhos (polarizados) dependendo do estado das mitocôndrias. Alíquotas de 10 μ L do sêmen e 20 oócitos descongelados serão coradas com JC-1 de acordo com o protocolo descrito por Godoy *et al.* (2013). Os gametas serão expostos a 5 μ M de JC-1 diluídos em água marinha filtrada durante 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra será lavada três vezes em água do mar filtrada e levada para observação em microscópio de fluorescência. A atividade mitocondrial bem como a distribuição das mitocôndrias será avaliada em três amostras (criotubos) de cada tratamento.

Determinação da concentração de ATP: O conteúdo de ATP nos gametas será medido imediatamente após descongelamento. Para a preparação do extrato, será seguido o procedimento descrito por Guan *et al.* (2008). Resumidamente, serão adicionadas alíquotas dos gametas a 1 mL de solução resfriada contendo 0,5 M de ácido perclórico + 4 mM EDTA e homogeneizados. O

homogeneizado será centrifugado a 17.000 X g durante 10 min em centrífuga refrigerada (4 °C). O sobrenadante será separado e neutralizado com 2,5 M KOH para ajustar o valor de pH entre 6 e 7. O sobrenadante neutralizado será então centrifugado durante 5 min a 8000 X g e o novo sobrenadante será novamente recolhido. Este extrato será colocado em tubos Eppendorf e armazenado a -20 °C até a determinação do ATP. O ATP liberado dos gametas será mensurado utilizando um kit de ensaio de bioluminescência baseado na reação de luciferina-luciferase (FL-AA, Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante. Um luminômetro será utilizado para as medições. A luz de fundo (Background) será mensurada e subtraída correndo um branco contendo água deionizada. Uma curva de calibração padrão de sete pontos será rotineiramente incluída em cada ensaio. A concentração de ATP será determinada pela fórmula da regressão linear da curva padrão. Gametas do grupo controle (mantidos em água do mar filtrada) e grupos congelados serão analisados em triplicatas.

3.8 Reprodução *in vitro* do coral-cérebro e desenvolvimento larval

O estabelecimento de um protocolo de reprodução *in vitro* é fundamental quando se trata de uma espécie ameaçada de extinção. Nesse experimento nós iremos determinar a dose inseminante, ou seja, a concentração ótima de espermatozoides necessários para fecundar os oócitos. Esse conhecimento será essencial e terá aplicação em todos os demais experimentos a fim de comprovar a capacidade dos gametas em fecundar e ser fecundado.

Tubos de vidro contendo 5 mL de AMF e 20 oócitos serão distribuídos ao acaso, com tratamentos dispostos em esquema fatorial 5 x 2 x 2, sendo o primeiro fator referente às concentrações espermáticas (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 espermatozoides/mL), o segundo fator correspondente aos tempos de exposição dos oócitos aos espermatozoides (5 e 10 min) e o terceiro fator correspondente aos procedimentos pós fecundação (enxaguar os ovos em AMF e não enxaguá-los). Serão utilizadas cinco réplicas (tubos) por tratamento. A taxa de fertilização será avaliada após 12 horas. A partir do estabelecimento do melhor protocolo para reprodução *in vitro*, a capacidade de fecundação dos gametas descongelados será avaliada.

O desenvolvimento da prole oriunda dos gametas congelados será integralmente avaliado. Para cada tratamento de uma determinada data de fecundação, um número igual de larvas (larvas produzidas a partir de gametas frescos ou congelados) será colocado em tanques de 20 L. O número total adicionado aos tanques de assentamento dependerá do sucesso da fertilização e do número de larvas ao final do período de avaliação. Após uma semana, o número total de recrutas será contado, utilizando um estereomicroscópio. O sucesso do assentamento será determinado pela razão entre o número total de recrutas assentados dividido pelo número total de larvas colocadas no tanque. Dessa forma, será possível determinar o número de recrutas de corais aptos para povoar áreas de recifes degradados.

3.9 Criação do banco de gametas do coral-cérebro

Nessa etapa da pesquisa será possível criarmos o primeiro banco de gametas de coral do Atlântico Sul utilizando a espécie *M. harttii* como modelo.

Objetivamos estabelecer um banco com pelo menos 1000 (mil) amostras de gametas congelados. O banco será gerenciado de forma a ter o controle digital do número de amostras estocadas, as quais serão identificadas por meio de um código que permitirá saber o tipo de gameta (masculino ou feminino), data do congelamento e a diversidade genética do lote (verificada por genotipagem).

3.10 Plano de comunicação do projeto

O andamento do projeto e seus resultados serão divulgados na fanpage (Projeto ReefBank) no *Facebook* e no perfil no Instagram, com o objetivo de se aproximar da sociedade e falar de ciência ambiental e recifes de corais de uma forma simples e interativa. Para tal, um membro da equipe será responsável por postagens semanais. O Coral Vivo, por meio de sua assessoria de comunicação e *fanpage* com mais de 274 mil seguidores será um forte parceiro na divulgação do nosso projeto.

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 dispõe de laboratório para preparação de amostras e está equipado com 3 microscópios eletrônicos de varredura, 2 microscópios eletrônicos de transmissão e 1 microscópio confocal.

5. CRONOGRAMA A SER CUMPRIDO

ATIVIDADES PREVISTAS	ANO / QUADRIMESTRES							
	2019		2020		2021			
Reuniões mensais da equipe	■	■	■	■	■	■	■	■
Aquisição de equipamentos	■							
Aquisição de reagentes			■			■		
Caracterização morfológica dos gametas		■	■					
Avaliação da sensibilidade dos gametas ao resfriamento		■	■					
Avaliação da toxicidade dos crioprotetores		■	■					
Protocolo de congelamento dos gametas			■		■	■		
Avaliação da viabilidade dos gametas pós-descongelamento			■		■	■		
Protocolo de reprodução <i>in vitro</i>	■	■	■					
Avaliação de desenvolvimento de larvas e recrutas		■	■		■	■		
Avaliação da diversidade genética dos gametas e prole		■	■		■	■		
Criação do banco de gametas congelados					■	■	■	
Análise estatística e processamento dos dados	■	■	■	■	■	■	■	
Redação e submissão de artigos científicos		■	■	■	■		■	■
Relatórios parciais			■		■			■
Participação em eventos técnico/científicos		■	■			■		■
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 (descrever cada item)	Ponteira micropipeta s/ filtro 0,1-10 µl	Sim	8	Pct c/ 1000	56,45	451,60
	Ponteira micropipeta s/ filtro 1-200 µl	Sim	8	Pct c/ 1000	49,40	395,20
	Ponteira micropipeta s/filtro 1000-5000 µl	Sim	6	Pct c/ 100	39,81	238,86
	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	283,10
	Tube tipo Falcon 15 ml fundo cônico	Sim	8	Pct c/ 100	50,34	402,72
	Tube tipo Falcon 50 ml fundo cônico	Sim	15	Pct c/ 50	33,25	498,75
	Tube 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	52,00	52,00
	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	10,00	100,00
	Lamínula p/ microscopia 18x18 mm	Sim	2	Cx c/ 1000	23,77	47,54
	Palheta plástica 0,25 ml	Sim	1	Pct c/ 2000	537,26	537,26
	Esfera de metal p/ lacrar palheta de 0,25 ml	Sim	10	Pct c/ 100	11,58	115,80
	Caixa térmica de isopor 5 L	Sim	1	cx	34,90	34,90
	Seringa descartável 10 ml s/ agulha	Sim	1	Cx c/ 100	31,41	31,41
	Seringa descartável 1 ml insulina c/ agulha	Sim	1	Cx c/ 100	37,40	37,40
	Filtro 0,2 µm p/ seringa	Sim	1	Pct c/ 100	426,25	426,25
	Glicose Frasco	Sim	1	100g	145,00	145,00

NAYARA OLIVEIRA DA CRUZ

	Sulfato de gentamicina Frasco	Sim	1	250mg	276,00	276,00
	JC-1 Dye - Frasco	Sim	1	5mg	3.115,00	3.115,00
	Tubo criogênico 2 ml c/ tampa rosca externa	Sim	10	Pct c/ 100	45,00	450,00
	Eosina Y - Frasco	Sim	1	5g	319,00	319,00
	Nigrosina - Frasco	Sim	1	25g	212,00	212,00
	Citrato trissódico dihidratado - Frasco	Sim	1	500g	171,00	171,00
	Propilenoglicol - Frasco	Sim	1	500ml	1.336,00	1.336,00
	Dimetilsulfóxido - Frasco	Sim	1	500ml	688,00	688,00
	Dimetilacetamida - Frasco	Sim	1	1L	439,00	439,00
	Etilenoglicol - Frasco	Sim	1	1L	445,00	445,00
	Abastecimento de nitrogênio líquido	Sim	150	L	37,00	5.550,00
Serviço de terceiros Pessoa Física			1		1.723,57	1.723,57
Viagens	Passagem aérea Porto Alegre/Porto Seguro/Porto Alegre	Não	6		1.007,00	6.042,00
	Hospedagem + Alimentação	Não	20	Diária	300,00	6.000,00
Equipamentos	Botijão Dry shipper 8 L	Sim	1	Unidade	4.525,92	4.525,92
Outros (específico para o projeto)	Manutenção hidráulica dos viveiros da base de pesquisa	Sim	1		4.000,00	4.000,00
TOTAL						40.000,00

7. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO PREVISTO

Contribuição Tecnológica e de Inovação para Conservação da Natureza:

- Estabelecer um protocolo para congelamento dos espermatozoides e oócitos do coral-cérebro, permitindo sua estocagem por tempo indeterminado.
- Criar o primeiro banco de gametas de coral do Atlântico Sul utilizando como modelo a espécie *M. Harttii*. O banco com pelo menos 1000 amostras terá controle digital das informações, como o tipo de gameta, data do congelamento e a diversidade genética do lote.
- Estabelecer um protocolo para reprodução *in vitro* do coral-cérebro, permitindo a manipulação dos gametas.
- Descongelar os gametas quando desejado, gerando novos recrutas de corais que poderão ser utilizados na recuperação de recifes degradados.

Contribuição científica:

- Beneficiar a comunidade científica por meio da publicação de quatro artigos científicos em periódicos de alto impacto nas áreas de Conservação, Recifes de Corais, Criobiologia, Biologia & Fisiologia Reprodutiva.
- Formação de recursos humanos, prezando pela capacitação e iniciação à ciência de alunos de graduação e qualificação em nível de pós-graduação. Serão fruto desse projeto: uma tese de doutorado e três TCCs.
- Divulgação dos resultados em importantes congressos científicos, promovendo *networking* e interação dos membros da equipe com a comunidade científica da área.

Impactos na sociedade:

- Se aproximar da sociedade e falar de ciência ambiental e recifes de coral de uma forma simples e interativa.
- Criar uma fanpage (Projeto ReefBank) no Facebook e um perfil no Instagram para transmitir informações acerca da conservação dos ambientes marinhos e divulgar as ações e resultados do projeto.
- Um membro da equipe será responsável por fazer postagens semanais e interagir diretamente com os seguidores.

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.
- Blom, E. 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility* (1), 176-177.
- 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.
- Evenson, D.P.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, M.R. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* (210), 1131-1133.
- Freckelton, M. L., Nedved, B. T., & Hadfield, M. G. 2017. Induction of Invertebrate Larval Settlement; Different Bacteria, Different Mechanisms? *Scientific Reports*, 7, 42557.
- Godoy, L.C.; Streit, D.P.; Zampolla, T.; Bos-Mikich, A.; Zhang, T. 2013. A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology* (67), 347-354.
- Guan, M.; Rawson, D.M.; Zhang, T. 2008. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols. *Cryobiology*, 56:204-8.
- Gwo, J.C.; Chen, C.W.; Cheng, H.Y. 2002. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology* (58), 1563-1578.
- Gwo, J.C. 2000. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research* (31), 259-271.

- Hagedorn, M.; Carter, V.; Henley, M.; Oppen, M.J.H.V.; Hobbs, R. Spindler, R. 2017. Producing coral offspring with cryopreserved sperm: A tool for coral reef restoration *Scientific Reports* (7)
- 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.
- Heron, S.F.; Maynard, J.A.; Hooidonk, R.V.; Eakin, C.M. 2016. Warming trends and bleaching stress of the World's coral reefs 1985-2012. *Scientific Reports* (6): 38402.
- Heyward, A. J., and A. P. Negri. 1999. Natural inducers for coral larval metamorphosis. *Coral Reefs* 18:273-279.
- 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.
- Jones, K.H.; Senft, J.A. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidiumiodide. *J. Histochem. Cytochem*, 33 (1):77-9.
- Laikre L, Allendorf FW, Aroner LC, Baker CS, Gregovich DP, Hansen MM, Jackson JA, Kendall KC, McKelvey K, Neel MC, Olivieri I, Ryman N, Schwartz MK, Bull RS, Stetz JB, Tallmon DA, Taylor BL, Vojta CD, Waller DM, Waples RS. 2010. Neglect of genetic diversity in implementation of the convention on biological diversity. *Conservation Biology* 24:86-88
- 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.

- Lin, C.; Kuo, F.W.; Chavanich, S.; Viyakarn, V. 2014. Membrane lipid phase transition behavior of oocytes from three gorgonian corals in relation to chilling injury. *PLoS ONE* 9(3): e92812. doi:10.1371/journal.pone.0092812.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247 (Cell Physiol. 16): C125-C142.
- MMA, 2014. Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. DOU, Seção 1, Nº 245.
- Morse, A. N. C., K. Iwao, M. Baba, K. Shimoike, T. Hayashibara, and M. Omori. 1996. An ancient chemosensory mechanism brings new life to coral reefs. *Biol. Bull.* 191:149-154.
- 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.
- Paredes, E. 2015. Exploring the evolution of marine invertebrate cryopreservation – Landmarks, state of the art and future lines of research. *Cryobiology* (71), 198-209.
- Rawson, D.M.; McGregor, G.; Reid, R.E. Lloyd. 2011. Conservation rationale, research applications and techniques in the cryopreservation of lower vertebrate biodiversity from marine and freshwater environments, *Int. Zoo. Yb.* 45, 1–16.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. & Zilber-Rosenberg, I. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 355–362.
- Santos, H.F., Duarte, G.A., Rachid, C.T., Chaloub, R.M., Calderon, E.N., Marangoni, L.F., et al. 2015. Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. *Sci Rep* 5, 18268.
- Tsai, S.; Yang, V.; Lin, C. Comparison of the cryo-tolerance of vitrified gorgonian oocytes. 2016. *Scientific Reports* 6, Article number: 23290.
- Tsai, S.; Rawson, D.M.; Zhang, T. 2009. Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology*, 58, 279-286.

- Veron, J.E.N. 2000. *Corals of the World*. Vol 3. Townsville, Australia: Australian Institute of Marine Sciences. 1382 p.
- Wallace, R.A.; Selman, K. 1981. Cellular dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am Zool*, 21:325-43.
- Webster, N. S., Smith, L. D., Heyward, A. J., Watts, J. E. M., Webb, R. I., Blackall, L. L., & Negri, A. P. 2004. Metamorphosis of a Scleractinian Coral in Response to Microbial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1213–1221.
- 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.

