

Designação do Projeto	TRANSFISH: Aclimação transgeracional de peixes temperados às alterações climáticas
Código do Projeto	LISBOA-01-0145-FEDER-028647 ALG-01-0145-FEDER-028647
Objetivo Principal	Reforçar a investigação, o desenvolvimento tecnológico e a inovação
Região de Intervenção	Lisboa e Algarve
Entidades Beneficiárias	FCiências.ID – Associação para a Investigação e Desenvolvimento de Ciências NOVA.ID.FCT – Associação para a Inovação e Desenvolvimento da FCT IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P. Centro de Ciências do Mar do Algarve
Data de Aprovação	27-06-2018
Data de Início	01-12-2018
Data de Conclusão	30-11-2022
Custo Total Elegível	235.738,96€
Apoio Financeiro da União Europeia	FEDER – 94.295,59€
Apoio Financeiro Público Nacional/ Regional	OE – 141.443,37€

Objetivos

«Desde a revolução industrial, as concentrações atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂) têm vindo aumentar a um ritmo invulgarmente rápido, desde 280 µatm até aos atuais níveis de 399 µatm. Para o final do século XXI, estima-se que estes valores possam chegar às 1000 µatm. Os oceanos são um dos maiores reservatórios de CO₂ atmosférico e a sua continua absorção está a causar um declínio no pH dos oceanos, sendo expectável que diminua entre 0,14 e 0,42 unidades até 2100. Paralelamente, a



temperatura da superfície do mar deverá aumentar até cerca de 3°C. Estas mudanças sem precedentes estão a causar profundos impactos nos sistemas marinhos costeiros, detentores de uma relevância ecológica e socioeconómica inquestionável, e que atualmente enfrentam múltiplos fatores de stress. Estudos sobre os impactos das alterações climáticas dos oceanos em organismos marinhos ainda é um tema emergente, uma vez que existem ainda lacunas de conhecimento relativamente sobre os efeitos sinérgicos de múltiplos fatores; a vulnerabilidade de estados de vida sensíveis e sobre o potencial de aclimação transgeracional. A maioria dos estudos apenas se tem debruçado sobre um estado de vida, negligenciando o potencial de aclimação que a longo prazo pode ser um importante mecanismo para mediar os impactos nas espécies marinhas.

O objetivo geral deste projeto de três anos é o de avaliar, pela primeira vez, as capacidades de aclimação transgeracional de peixes marinhos temperados às mudanças climáticas. Reprodutores e descendentes de dourada (*Sparus aurata*), uma espécie comercialmente importante, serão aclimatados a níveis de aquecimento (3°C acima da temperatura ambiente) e hipercapnia (1000 μ atm, Δ pH=0,4) esperados para 2100. Este projeto permitir-nos-á ter uma visão holística e integrada das estratégias de aclimação e das respostas biológicas, nomeadamente ecofisiológicas (Tarefa 2), comportamentais (Tarefa 3), endocrinológicas (Tarefa 4) e transcriptómicas (Tarefa 5) dos peixes às alterações climáticas. Simultaneamente irá melhorar a nossa capacidade de gestão preditiva de modo a proteger a biodiversidade marinha em cenários climáticos futuros.»

Atividades

«No primeiro ano do projeto foi criado o site do TRANSFISH – <https://mpimentel2018.weebly.com/projects.html>, onde se pode aceder à página para divulgação do projeto e de atividades resultantes do mesmo. As primeiras experiências que decorreram no âmbito do TRANSFISH ocorreram entre Fevereiro e Junho 2019 nas instalações do IPMA, Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) e do MARE-LMG, Cascais. Os adultos da espécie dourada, *Sparus aurata* foram expostos ao aumento de temperatura durante este período, durante o qual foram retiradas amostras de ovos de posturas colocadas durante a experiência.

No primeiro ano do projeto foi também inaugurada uma exposição temporária no Museu do Mar, organizada e liderada pela PI e o Co-PI do projeto, intitulada “Alterações climáticas e os oceanos do futuro” (<https://www.cascais.pt/noticia/museu-do-mar-em-cascais-inaugura-exposicao-alteracoes-climaticas-e-os-oceanos-do-futuro>) onde foram apresentados e discutidos os efeitos das alterações climáticas nos peixes e onde se debateram quais as futuras linhas de investigação, incluindo as intenções de investigação do TRANSFISH. A exposição foi divulgada através de vários canais, tais como:



- 1) <https://ciencias.ulisboa.pt/en/node/10763>
- 2) <https://www.cascais.pt/evento/alteracoes-climaticas-e-os-oceanos-do-futuro>
- 3) <http://www.jornaldaeconomiaomar.com/museu-do-mar-recebe-exposicao-sobre-impacto-das-alteracoes-climaticas-no-oceano/>
- 4) <https://www.mtuapescadores.pt/?p=5590>
- 5) <https://www.pportodosmuseus.pt/2019/02/26/exposicao-no-museu-do-mar-em-cascais-alteracoes-climaticas-e-os-oceanos-do-futuro/>

No decorrer da exposição foram desenvolvidas diversas ações de disseminação de ciência e de comunicação para o público em geral, através de mais de 7 workshops “Quem tramou o clima” realizados conjuntamente com o programa “MARE vai à escola” do MARE-UL, que tiveram a participação de mais de 175 Pessoas, <https://www.cascais.pt/noticia/quem-tramou-o-clima>. A exposição esteve patente até 31 de Julho 2019 e a partir de Novembro 2019 passou a estar itinerante, iniciando o seu percurso no Algarve nomeadamente nos Centros de Ciência Viva (Lagos, Tavira e Faro) <https://www.ccvalg.pt/public/even.php?evid=1383>, Aeroporto de Faro e no Campus de Gambelas da Universidade do Algarve <https://www.ccmr.ualg.pt/news/climate-change-and-oceans-future-em-exibicao-no-ccv-em-tavira>. No âmbito do TRANSFISH foram realizadas durante o primeiro ano também diversas atividades de disseminação no MARE-Laboratório Marítimo da Guia, Cascais (MARE-LMG) com seis escolas de diversos concelhos “Oficina relativa ao estudo das Alterações climáticas no meio marinho: uma perspetiva ecológica”.

No decorrer do segundo ano do projeto iniciaram-se as experiências da exposição transgeracional dos ovos e larvas destes adultos. Tal como previsto no decorrer desta altura da época reprodutiva da dourada os adultos foram expostos a condições ambientais representativas das condições ambientais atuais e de aumento de temperatura expectáveis para o final do século. Os adultos da espécie dourada, *Sparus aurata* foram expostos ao aumento de temperatura durante 6 meses. Durante este período foram retiradas amostras de ovos de posturas colocadas durante a experiência, de sangue de todos os indivíduos, de óvulos de fêmeas e esperma de machos para análise futura. No decorrer da exposição dos adultos a estes tratamentos experimentais as posturas de ovos resultantes ao longo destes 6 meses permitiram continuar a experiência na geração seguinte. Pelo que foi possível fazer a exposição transgeracional aos ovos e larvas destes adultos nas instalações do LMG, MARE-UL ao aumento de temperatura previsto para o final do século. Deste modo para avaliar a capacidade de aclimação transgeracional da dourada ao aumento da temperatura (4°C) dos oceanos foram realizadas experiências com desenho experimental multifatorial de modo a avaliar o seu impacto na capacidade reprodutiva, desenvolvimento embrionário, taxas de eclosão, sobrevivência, crescimento, comportamento, capacidade metabólica, capacidade de resposta ao choque térmico e antioxidante, atividade digestiva, parâmetros hematológicos e endocrinológicos destes organismos.

Durante o segundo ano foram apresentados em congressos nacionais e internacionais os seguintes trabalhos:



1. Pegado, M.R., Mai, G.M., Sampaio, E., Caramelo, J., Pousão-Ferreira, P., Mendes, A., Rosa, R., Pimentel, M.S. (2021) Does parental exposure of seabream (*Sparus aurata*) to ocean warming affect the progeny's foraging and swimming behaviour? Conference of the Portuguese Society of ethology (SPE) 2021 Virtual Meeting.
2. Mai, M.G., Pegado, M.R., Pousão-Ferreira, P., Mendes, A.C., Rosa, R., Pimentel, M.S. (2021) Transgenerational effects of ocean climate changes on seabram (*Sparus aurata*) larvae fluctuability and phototactic behavior. Conference of the Portuguese Society of ethology (SPE) 2021 Virtual Meeting.
3. Pegado, M.R., Mai, G.M., Sampaio, E., Caramelo, J., Pousão-Ferreira, P., Mendes, A., Rosa, R., Pimentel, M.S. (2021) Does parental exposure of seabream (*Sparus aurata*) to ocean warming affect the progeny's behaviour?. Animal Behavior Society (ABS) 2021 Virtual Meeting.
4. Pimentel, M.S., Santos, C., Pegado, M.R., Sampaio, E., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R. (2021) Deleterious effects of the "deadly trio" on fish early ontogeny. 44th Annual Larval Fish Conference (Early Life History Section, AFS), 24-26th June, Virtual Meeting.
5. Mai, M.G., Pegado, M.R., Pousão-Ferreira, P., Mendes, A.C., Rosa, R., Pimentel, M.S. (2021) Transgenerational acclimation of seabram (*Sparus aurata*) to ocean warming. 44th Annual Larval Fish Conference (Early Life History Section, AFS), 24-26th June, Virtual Meeting.

Relativamente à contratação de bolseiros e de investigadores doutorados, no segundo ano do projeto foi renovada a contratação do bolseiro de técnico de investigação (BTI) uma vez que os trabalhos foram atrasados devido à pandemia COVID-19 de modo a dar continuidade à participação e colaboração nos ensaios experimentais do projeto TRANSFISH para a exposição de peixes marinhos a diferentes condições ambientais. A contratação de dois investigadores doutorados foi também efectuada neste ano.

No último ano do projeto foram cumpridos quase todas as metas previstas. Ao longo deste período foram terminadas as experiências de exposição transgeracional dos reprodutores, ovos e larvas de dourada ao aquecimento e iniciada a exposição à acidificação dos oceanos (tarefa 1). No final deste período foram avaliados e analisados parâmetros hematológicos e endocrinológicos (tarefas 2, 4 e 5) destes organismos, assim como no desenvolvimento embrionário, taxas de eclosão, sobrevivência, crescimento, stress antioxidante (tarefa 2) e comportamento (tarefa 3). Após a realização destas experiências e atendendo que não seria possível voltar a realizar experiências, durante o decurso do projeto TRANSFISH, com estes organismos devido aos seus períodos de reprodução e de postura, foi utilizado um outro organismo modelo com grande importância ecológica, o cavalo-marinho (*Hippocampus hippocampus*) de modo a colmatar parte dos objetivos iniciais propostos. Embora não estivesse ponderado inicialmente a realização de experiências com estes animais, este modelo biológico foi escolhido devido à sua importância ecológica e também ao facto de ser uma espécie fácil de reproduzir diversas gerações em cativeiro várias vezes ao ano (sem restrições de épocas de postura tal como acontece com as douradas) nas instalações do MARE-LMG, Cascais.



Ao longo do último ano foram apresentados em congressos nacionais e internacionais os seguintes trabalhos em formato poster e oral:

1. Pegado, M.R., Mai, G.M., Sampaio, E., Caramelo, J., Pousão-Ferreira, P., Mendes, A., Rosa, R., Pimentel, M.S. (2021) Does parental exposure of seabream (*Sparus aurata*) to ocean warming affect the progeny's foraging and swimming behaviour? Conference of the Portuguese Society of ethology (SPE) 2021 Virtual Meeting.
2. Mai, M.G., Pegado, M.R., Pousão-Ferreira, P., Mendes, A.C., Rosa, R., Pimentel, M.S. (2021) Transgenerational effects of ocean climate changes on seabram (*Sparus aurata*) larvae fluctuability and phototactic behavior. Conference of the Portuguese Society of ethology (SPE) 2021 Virtual Meeting.
3. Pegado, M.R., Mai, G.M., Sampaio, E., Caramelo, J., Pousão-Ferreira, P., Mendes, A., Rosa, R., Pimentel, M.S. (2021) Does parental exposure of seabream (*Sparus aurata*) to ocean warming affect the progeny's behaviour? Animal Behavior Society (ABS) 2021 Virtual Meeting.
4. Pimentel, M.S., Santos, C., Pegado, M.R., Sampaio, E., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R. (2021) Deleterious effects of the "deadly trio" on fish early ontogeny. 44th Annual Larval Fish Conference (Early Life History Section, AFS), 24-26th June, Virtual Meeting.
5. Mai, M.G., Pegado, M.R., Pousão-Ferreira, P., Mendes, A.C., Rosa, R., Pimentel, M.S. (2021) Transgenerational acclimation of seabram (*Sparus aurata*) to ocean warming. 44th Annual Larval Fish Conference (Early Life History Section, AFS), 24-26th June, Virtual Meeting.

Relativamente a atividades de divulgação científica foi dada continuidade à organização da exposição itinerante "Alterações climáticas e os oceanos do futuro". Desde janeiro 2021 até a atualidade a exposição tem estado exposta em diversas escolas do concelho de Cascais. Por todas as escolhas por onde tem passado a exposição, tem-se realizado palestras e workshops sobre o efeito das alterações climáticas nos oceanos. No âmbito do TRANSFISH e da exposição "Alterações climáticas e os oceanos do futuro" continuou-se a realizar palestras online e presenciais, assim como diversas atividades de disseminação ("Oficina relativa ao estudo das Alterações climáticas no meio marinho: uma perspetiva ecológica") com escolas de diversos concelhos.»

Resultados Atingidos

«Apesar do projeto ter sofrido alterações e atrasos extremamente excecionais, foram cumpridos quase todas as metas previstas nomeadamente, manutenção, criação e manutenção de website; preparação, submissão e publicação de mais de 8 artigos em revistas internacionais com arbitragem científica (e.g. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2893821/v1>, <https://www.mdpi.com/2410-3888/5/1/1>, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2899092/v1>); participação em 4 congressos nacionais e internacionais com a respetiva apresentação de 6 trabalhos; orientação de 3 teses de mestrado e 2 projetos de licenciatura, assim como a



supervisão de 1 bolseiro e 3 investigadores doutorados; criação da exposição “Alterações climáticas e os oceanos do futuro”; realização de workshops temporária e itinerante (Algarve, Peniche, Lisboa, Madeira) e colóquios junto da comunidade escolar, piscatória e industrial no decorrer da exposição realizada e organizada pela IR do TRANSFISH; desenvolvimento de ações de disseminação e divulgação de ciência no âmbito do projeto TRANSFISH que tiveram a participação de mais de 300 pessoas e mais de 17 escolas de diversos concelhos.

Os resultados obtidos ao longo deste projeto indicam que independentemente da temperatura a que foram submetidos os reprodutores, as frequências cardíacas das larvas foram sempre mais altas apenas quando expostas diretamente a um aumento de temperatura. Contudo, relativamente as taxas de eclosão destas larvas houve uma tendência para que fosse superior no tratamento em que os genitores foram submetidos ao aumento de temperatura (tarefa 2). Relativamente ao tamanho do saco vitelino das larvas, a redução deste foi mais rápida em todos os tratamentos que implicaram a exposição dos reprodutores e/ou larvas ao aquecimento dos oceanos, sendo este consumo mais rápido no tratamento em que progenitores e descendência foram ambos expostos ao aumento de temperatura (tarefa 2). No entanto, neste tratamento as larvas apresentaram um crescimento mais lento, podendo indicar que as reservas nutricionais contidas no saco vitelino foram possivelmente usadas para manutenção da sua homeostasia e sobrevivência em vez de serem canalizadas para o crescimento (tarefa 2). Para além do saco vitelino, as larvas possuem também uma gota lipídica que lhes confere durante os primeiros dias de vida reservas energéticas. Os resultados obtidos indicam que a gota lipídica, de larvas expostas ao aquecimento provenientes de progenitores anteriormente expostos ao aquecimento dos oceanos, diminuiu consideravelmente (tarefa 2). Este facto pode indicar que os reprodutores, principalmente as fêmeas quando expostas a temperaturas mais altas tiveram menos reservas energéticas para depositar nos seus oócitos, ou seja, menos energia alocada para a reprodução e mais energia alocada para manutenção da sua própria homeostasia e sobrevivência. Relativamente ao tamanho dos otólitos das larvas não foram detetadas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos (tarefa 2). Relativamente ao comportamento das larvas também não foram detetados efeitos dos tratamentos no comportamento fototático e flutuabilidade das larvas, tendo sido apenas observado um efeito significativo na atividade natatória das larvas quando expostas a temperaturas diferentes dos seus progenitores (tarefa 3). A nível de alterações na defesa enzimática e na existência de possível dano celular, embora não tenha sido observado um efeito nas enzimas de stress oxidativo (catálase, sod, GPx) foi observado que a exposição previa dos reprodutores a aumentos de temperatura dá às larvas alguma capacidade de minimizar eventuais danos celulares (peroxidação lipídica) e de DNA quando expostas a estas mesmas condições. Da mesma forma, foi observada uma tendência para aumento de mecanismos de proteção e reparação de proteínas por parte das proteínas de choque térmico em larvas expostas às mesmas condições de aumento de temperatura dos progenitores, não tendo sido observadas diferenças a nível de remoção por parte da ação das ubiquitinas de proteínas que



pudessem estar eventualmente danificadas (tarefa 2,4,5). Embora se tenham observado algumas tendências e diferenças significativas com o aumento da temperatura, com a acidificação dos oceanos não foram detetadas diferenças significativas na taxa de eclosão, sobrevivência, crescimento, reservas energéticas, otólitos, comportamento, enzimas oxidativas, capacidade antioxidante, dano celular e DNA das larvas de dourada independentemente do tratamento a que estas foram expostas, assim como do tratamento dos seus progenitores (tarefa 2,3,4,5). Embora através da análise da condição energética das larvas indique que exista uma tendência para que os reprodutores tenham menos energia alocada para a reprodução e mais energia alocada para manutenção da sua própria homeostasia e sobrevivência, a nível da análise dos gâmetas dos reprodutores, não foram observadas diferenças relativamente às análises do sangue (eritrócitos), enzimas de stress oxidativo, mecanismos antioxidantes, dano celular, dano DNA, tanto quando expostos ao aumento da temperatura como à acidificação dos oceanos. No geral, os resultados obtidos ao longo do projeto TRANSFISH parecem indicar que a exposição previa dos reprodutores às alterações climáticas, principalmente ao aumento de temperatura, pode dar alguma capacidade adaptativa à sua descendência. Contudo, embora sejam transferidos por parte dos reprodutores alguns mecanismos que conferem uma capacidade adaptativa, estes podem não ser suficientes para assegurar o normal crescimento da sua descendência quando expostos a estas condições adversas.»

