

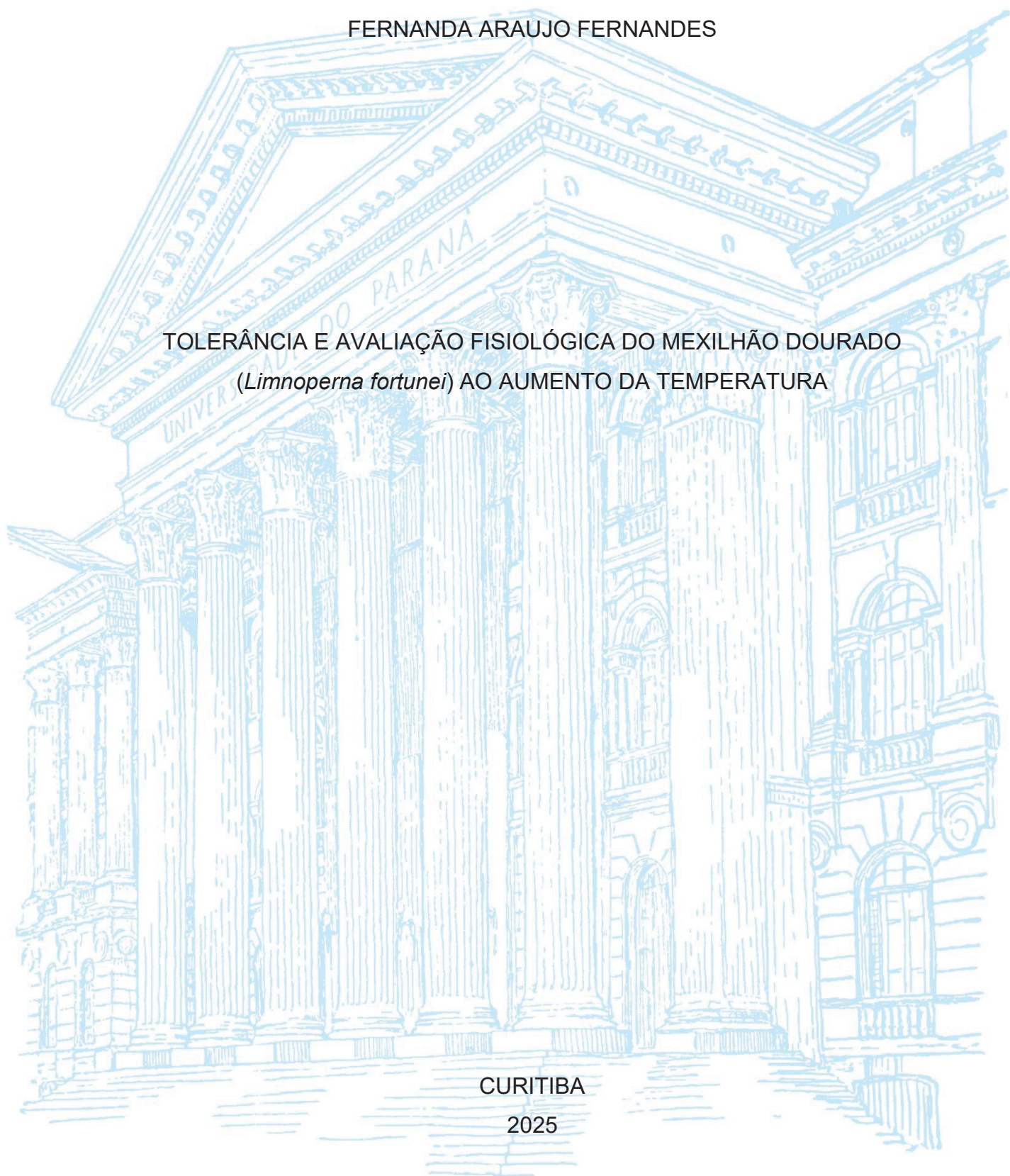
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA ARAUJO FERNANDES

TOLERÂNCIA E AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DO MEXILHÃO DOURADO
(*Limnoperna fortunei*) AO AUMENTO DA TEMPERATURA

CURITIBA

2025



FERNANDA ARAUJO FERNANDES

TOLERÂNCIA E AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DO MEXILHÃO DOURADO
(*Limnoperna fortunei*) AO AUMENTO DA TEMPERATURA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador(a): Prof (a). Dr (a). Luciana Rodrigues de Souza Bastos

Coorientador(a): Prof (a). Dr (a). Viviane Prodocimo

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Fernandes, Fernanda Araujo

Tolerância e avaliação fisiológica do mexilhão dourado
(*Limnoperna fortunei*) ao aumento da temperatura / Fernanda
Araujo Fernandes. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia.

Orientadora: Prof (a). Dr (a). Luciana Rodrigues de Souza
Bastos.

Coorientadora: Prof (a). Dr (a). Viviane Prodocimo.

1. Mexilhão dourado. 2. Temperatura (Efeito fisiológico). 3.
Espécies introduzidas. I. Souza-Bastos, Luciana Rodrigues de,
1983-. II. Prodocimo, Viviane, 1974. III. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM FISIOLÓGIA

No dia vinte e seis de fevereiro de dois mil e vinte e cinco às 09:00 horas, na sala 103, Defesa Híbrida através do Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **FERNANDA ARAUJO FERNANDES**, intitulada: "**Tolerância e avaliação fisiológica do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) ao aumento da temperatura**", sob orientação do Profa. LUCIANA RODRIGUES SOUZA BASTOS. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISIOLÓGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LUCIANA RODRIGUES SOUZA BASTOS, TIAGO GABRIEL CORREIA, ENELISE MARCELLE AMADO (null). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUCIANA RODRIGUES SOUZA BASTOS, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

06/03/2025 14:00:39.0

LUCIANA RODRIGUES SOUZA BASTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/03/2025 11:41:27.0

TIAGO GABRIEL CORREIA

Avaliador Externo

Assinatura Eletrônica

27/02/2025 21:40:29.0

ENELISE MARCELLE AMADO

Avaliador Externo (null)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA ARAUJO FERNANDES**, intitulada: **"Tolerância e avaliação fisiológica do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) ao aumento da temperatura"**, sob orientação do Profa. LUCIANA RODRIGUES SOUZA BASTOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

06/03/2025 14:00:39.0

LUCIANA RODRIGUES SOUZA BASTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/03/2025 11:41:27.0

TIAGO GABRIEL CORREIA

Avaliador Externo

Assinatura Eletrônica

27/02/2025 21:40:29.0

ENELISE MARCELLE AMADO

Avaliador Externo (null)

Aos meus pais e minha irmã. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Luciana Rodrigues de Souza Bastos, pela valiosa oportunidade de estágio que me foi concedida durante a graduação, bem como pela chance de prosseguir com meus estudos no mestrado. Gostaria de agradecer pela disponibilidade em me orientar de maneira dedicada, paciente e sempre presente.

À minha coorientadora, Viviane Prodocimo, por ter aceitado prontamente o desafio de me coorientar neste projeto. Sou grata pela sua paciência e pela disponibilidade em oferecer auxílio. A sua colaboração foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, expresso minha profunda gratidão pela dedicação em minha criação e pelo constante incentivo aos meus estudos. Agradeço por sempre acreditarem em mim e por me apoiarem em cada uma de minhas escolhas. O exemplo e o suporte que recebi foram fundamentais para o meu desenvolvimento e para cultivar o meu interesse em trabalhar com ciência desde pequena. Embora minha mãe não esteja mais presente, seu exemplo de vida foi essencial ao longo de todo esse processo.

À minha irmã, pelo apoio incondicional em todas as minhas escolhas e pela sua constante presença em todos os momentos significativos da minha vida. Agradeço pela paciência em me ouvir durante os inúmeros ensaios de aulas e apresentações, bem como nos momentos desafiadores que enfrentei. Sua disposição em me escutar foi sempre muito importante.

À minha prima Nataly Fernandes pelos momentos em que esteve presente e as conversas a respeito da vida acadêmica.

Às minhas amigas, Bianca Del Bianco, Flávia Ferreira e Mayara Silva, por estarem ao meu lado em diversos momentos. Agradeço pela paciência em lidar com a minha ausência em algumas ocasiões e pelos momentos de descontração e risadas que me proporcionaram.

Aos meus amigos de faculdade, Alessandra Oliveira, Esther Barbosa, Keila Alves, Laura Matias e Rodrigo Silva, por todos os momentos que compartilhamos e pelas alegrias que me proporcionaram. A presença de cada um de vocês foi especial na minha formação.

À minha psicóloga Cristiane Guimarães, por me auxiliar em vários momentos da minha vida.

Aos meus amigos de laboratório, em especial à Ketlyn Grezzana, que esteve ao meu lado durante todo o projeto e contribuiu em diversos experimentos e análises, obrigada pela sua disponibilidade em ajudar e por sua presença. Ao Fellip Marcondes, pela presença em muitos momentos, pelas conversas durante o almoço e leitura atenta de alguns dos meus textos. A colaboração de ambos foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À técnica do laboratório Kelly Riby pela disponibilidade em me auxiliar durante as análises e experimentos.

Ao professor Ricardo Fernandez Perez pela assistência ao ceder o fotômetro de chama para a realização das minhas análises. Agradeço também à sua aluna Sofia Arioni pelo apoio prestado durante o processo.

À professora Maritana Prodocimo, pela realização das análises de microscopia.

Agradeço imensamente a Leonardo Bastos e Maurício Belezia, responsáveis pela coleta dos mexilhões, cuja contribuição foi importante para o desenvolvimento do meu trabalho. A dedicação e o esforço de ambos foram essenciais para o êxito do projeto.

À banca avaliadora composta pelos professores Dr Thiago Gabriel Correia e Dr^a Enelise Marcelle Amado, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com o meu trabalho.

À Prof^a Dr^a Marisa Fernandes por avaliar o meu projeto e contribuir com suas correções.

Ao LACTEC pela oportunidade de concessão de bolsa e pela infraestrutura necessária para realização das coletas, experimentos e análises. Agradeço também por ter possibilitado a minha participação no congresso.

À CTG pelo financiamento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia pela oportunidade concedida e pelo suporte para o desenvolvimento da dissertação, realização das disciplinas e a resolução de dúvidas.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de desenvolver a minha dissertação, bem como pelo suporte acadêmico e infraestrutura disponibilizados ao longo deste processo.

“O poder criativo da natureza está muito além do instinto de destruição do homem”.
(Júlio Verne, Vinte Mil Léguas Submarinas)

RESUMO GERAL

O mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*), um bivalve dulcícola asiático, foi introduzido na América do Sul em 1991 por meio da água de lastro de navios, sendo registrado no Brasil em 1998, no Rio Guaíba (RS). Desde então, tornou-se uma espécie invasora preocupante, afetando sete das doze bacias hidrográficas do país e causando impactos econômicos e ambientais, como obstrução de tubulações e contaminação da água devido ao uso de produtos químicos no controle. A espécie apresenta alta tolerância térmica, sobrevivendo entre 5 e 47,3°C e reproduzindo-se entre 26 e 28°C. Apesar de diversos estudos sobre a sobrevivência e abundância larval da espécie em diferentes temperaturas, não foram encontradas pesquisas sobre seus limites de tolerância térmica em distintos estágios de desenvolvimento nem sobre as respostas fisiológicas ao estresse térmico. Assim, este trabalho avaliou a tolerância térmica do mexilhão-dourado em cinco classes de tamanho, determinando a temperatura letal média para cada uma e analisando os parâmetros fisiológicos basais e as respostas ao estresse térmico. Para determinar os limites térmicos da espécie em diferentes fases de desenvolvimento, as temperaturas experimentais foram estabelecidas em 30, 35, 40 e 50°C. A média de temperatura para o grupo controle foi de 23,32°C. Os experimentos de determinação da tolerância térmica ocorreram em um período de 60 min para as larvas e 96 h para as demais classes, sob condições estáticas. Para a avaliação fisiológica, bioquímica e histológica foram realizados experimentos com indivíduos juvenis II e adultos expostos duração de 96h horas a uma temperatura subletal de 32°C. Os indivíduos sobreviventes foram retirados do experimento e coletadas amostras de tecido e hemolinfa para análises de concentração de íons e atividade enzimática. A temperatura letal média (TL50) para os mexilhões pertencentes à Classe I (Larvas) foi de 37,79°C (n=307/ml), Classe II (pós larvas) 30,44°C (n=80), Classe III (Juvenis I) 32,55°C (n=80), Classe IV (Juvenis II) 34,65 °C (n=80) e Classe V (Adultos) 34,68 °C (n=80). Quanto aos experimentos subletais, os animais expostos a 32°C apresentaram aumento significativo na concentração de lactato tanto na hemolinfa ($p=0,023$), quanto na água da cavidade do manto ($p=0,014$), em relação ao grupo controle. O grupo experimental apresentou alterações nos filamentos branquiais, como dilatação do seio hemolinfático e vacuolização epitelial, enquanto o controle mostrou estrutura normal. Apesar da temperatura letal média de 34°C, a exposição subletal a 32°C induz alterações metabólicas significativas, sem causar desequilíbrios osmo-iônicos, indicando tolerância ao estresse térmico. Conhecer os limites de tolerância térmica do *L. fortunei* em diferentes estágios de desenvolvimento é essencial para prever sua invasividade e desenvolver estratégias de controle mais eficazes, diante da ausência de métodos eficientes para conter essa espécie invasora.

Palavras-chave: estresse térmico, espécies invasoras, mexilhão-dourado, termoregulação, ecofisiologia.

GENERAL ABSTRACT

The golden mussel (*Limnoperna fortunei*), an asian dulcicolous bivalve, was introduced to south america in 1991 via ships' ballast water and was recorded in Brazil in 1998, in the gualba river (RS). Since then, it has become an invasive species of concern, affecting seven of the country's twelve river basins and causing economic and environmental impacts, such as clogging pipes and water contamination due to the use of chemical control products. The species has high thermal tolerance, surviving between 5 and 47.3°C and reproducing between 26 and 28°C. Despite several studies on the survival and larval abundance of the species at different temperatures, no research has been found on its thermal tolerance limits at different stages of development or on the physiological responses to thermal stress. Therefore, this study evaluated the thermal tolerance of the golden mussel in five size classes, determining the average lethal temperature for each one and analyzing the basal physiological parameters and responses to thermal stress. To determine the thermal limits of the species at different stages of development, the experimental temperatures were set at 30, 35, 40 and 50°C. The average temperature for the control group was 23.32°C. The experiments to determine thermal tolerance took place over a period of 60 min for the larvae and 96 h for the other classes, under static conditions. For the physiological, biochemical and histological assessment, experiments were carried out with juvenile II and adult individuals exposed for 96 hours at a sublethal temperature of 32°C. The surviving individuals were removed from the experiment and tissue and hemolymph samples were collected for analysis of ion concentration and enzyme activity. The average lethal temperature (TL50) for mussels belonging to Class I (Larvae) was 37.79°C (n=307/ml), Class II (post larvae) 30.44°C (n=80), Class III (Juveniles I) 32.55°C (n=80), Class IV (Juveniles II) 34.65°C (n=80) and Class V (Adults) 34.68°C (n=80). As for the sublethal experiments, the animals exposed to 32°C showed a significant increase in the concentration of lactate both in the hemolymph (p=0.023) and in the water in the mantle cavity (p=0.014), compared to the control group. Histopathologically, the experimental group showed alterations in the gill filaments, such as dilation of the hemolymphatic sinus and epithelial vacuolization, while the control group showed normal structure. Despite the average lethal temperature of 34°C, sublethal exposure to 32°C induces significant metabolic changes, without causing osmo-ionic imbalances, indicating tolerance to thermal stress. Understanding the thermal tolerance limits of *L. fortunei* at different developmental stages is essential for predicting its invasiveness and developing more effective control strategies, given the current lack of efficient methods to manage this invasive species.

Keywords: thermal stress; invasive species; golden mussel; thermoregulation; ecophysiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Larva de <i>L. fortunei</i> em estágio Véliger de Charneira Reta (aumento 40 vezes = 25 μ m).	27
Figura 2. Animais em aquários individuais, submetidos às condições controle (A e B) e experimentais (C e D)	30
Figura 3. Mortalidade de larvas (%) em cada temperatura testada (C°) em 20, 40, 60 min	32
Figura 4. Mortalidade (%) das classes II (Pós larvas), III (Juvenis I), IV, (Juvenis II) e V (Adultos) em cada temperatura testada (C°)	34
Figura 5. Osmolalidade (Osm) em hemolinfa e manto dos grupos controle e experimental.....	48
Figura 6. Concentração de íons Na ⁺ e Cl ⁻ em hemolinfa e manto dos grupos controle e experimental	49
Figura 7. Concentração de íons Ca ²⁺ , Mg ²⁺ e K ⁺ em hemolinfa e manto dos grupos controle e experimental.....	50
Figura 8. Concentração de glicose e lactato em hemolinfa e manto dos grupos controle e experimental.....	51
Figura 9. Teor de hidratação determinado em exemplares de <i>L. fortunei</i> submetidos aos grupos controle e experimental (32°C).....	52
Figura 10. Atividade ATPasica total e atividade específica das enzimas Na ⁺ K ⁺ -ATPase, H ⁺ ATPase e anidrase carbônica..	53
Figura 11. Alterações histopatológicas na microestrutura das brânquias de <i>L. fortunei</i> coradas com hematoxilina e eosina..	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros abióticos da água bruta coletada no ponto de filtragem para obtenção das larvas de mexilhão-dourado	26
Tabela 2. Parâmetros abióticos medidos no ponto de amostragem de mexilhão-dourado, barragem da Usina Hidrelétrica de Itaipu, Foz do Iguaçu/PR	28
Tabela 3. Parâmetros abióticos determinados nos aquários de aclimação.....	29
Tabela 4. Média do tamanho dos mexilhões (cm) de cada classe em cada temperatura testada	29
Tabela 5. Média dos parâmetros abióticos (temperatura e amônia) determinada em cada uma das condições (controle - CT e experimental – EXP) experimentais.....	30
Tabela 6. Temperaturas letais (TL; °C) determinadas para 10, 50, 90 e 99% das larvas de mexilhão-dourado (L. fortunei) expostas por 60 min a temperaturas entre 30 e 50°C	31
Tabela 7. Temperaturas letais (TL; °C) determinadas para 10, 50, 90 e 99% dos mexilhões-dourados (L. fortunei) expostos, por 96h, a temperaturas entre 30 e 50°C	33
Tabela 8. Parâmetros abióticos dos aquários de aclimação Erro! Indicador não definido.	

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CaCO_3	- Carbonato de Cálcio
Ca^{2+}	- Íon cálcio
CO_2	- Dióxido de carbono
H^+	- Íon hidrogênio
HCO_3^-	- Íon bicarbonato
H_2CO_3^-	- Ácido carbônico
K^+	- Íon potássio
Mg^{2+}	- Íon magnésio
Na^+	- Íon sódio
$\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$	- Bomba de sódio e potássio
$\text{H}^+ \text{-ATPase}$	- Próton ATPase
$^{\circ}\text{C}$	- Graus Celcius
$^{\circ}\text{dH}$	- Dureza
h	- Hora
L	- Litro
Lux	- Iluminância
mL	- Mililitro
Mg	- Miligrama
mg/dL	- Miligrama por decilitro
mg/L	- Miligrama por litro
mM	- Milimolar
mm	- Milímetro
mOsm.Kg H_2O^{-1}	- Miliosmoles por quilograma de água
nm	- Nanômetro
ppm	- Partes por milhão
$\mu\text{S/cm}$	- Microsiemens por centímetro
ATP	- Adenosina trifosfato
OsM	- Osmose molar
$\mu\text{mol ADP} \text{mg} \text{proteína}^{-1} \text{h}^{-1}$	- Micromoles de ADP por miligrama de proteína por hora;
TL50	- Temperatura letal média
MS	- Mato Grosso do Sul

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

± - mais ou menos

Sumário

1 Introdução Geral.....	17
2 Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.1.1 Objetivos Específicos	19
Capítulo 1: Tolerância térmica do mexilhão-dourado (<i>Limnoperna fortunei</i>)....	20
Resumo	21
Introdução.....	23
Material e Métodos	26
Coleta, manutenção e experimentação com larvas de <i>L. fortunei</i>	26
Coleta, manutenção e experimentação com os demais estágios de desenvolvimento de <i>L. fortunei</i>	28
Experimentos De Tolerância Térmica Com Larvas De <i>L. Fortunei</i>	31
Experimentos De Tolerância Térmica Com Pós-Larvas, Juvenis E Adultos De <i>L. Fortunei</i>	32
Discussão	34
Capítulo 2: Avaliação Fisiológica De <i>Limnoperna Fortunei</i> (Dunker,1857) Ao Aumento Da Temperatura.....	38
Resumo	39
Introdução.....	40
Material e Métodos	42
Amostragem E Aclimação Dos Animais Em Laboratório.....	43
Experimentos De Exposição A Temperatura Subletal	43
Análise Das Amostras	44
Osmolalidade (Osm)	45
Dosagens De Íons.....	45
Dosagens De Glicose E Lactato.....	45
Teor Hídrico.....	45
Quantificação Proteínas Totais	46
Atividade Das Enzimas Na^+/K^+ Atpase E H^+ Atpase	46
Atividade Específica Da Anidrase Carbônica (Ac).....	46
Análise Histopatológica	46
Análises Estatísticas.....	47

Resultados	48
Discussão	54
Considerações Finais	59
Referências	60

INTRODUÇÃO GERAL

Limnoperna fortunei (Dunker, 1857 Mollusca: Bivalvia) (mexilhão-dourado) é uma espécie de bivalve dulcícola invasora originária do sudeste asiático (Boltovskoy et al., 2022), caracterizado por sua coloração marrom e pela ausência de dimorfismo sexual. Seu ciclo de vida é constituído de quatro fases larvais bem definidas, são elas: trocófora, véliger de charneira reta, véliger umbonada e larva plantígrada (Cataldo, 2015). A concha do mexilhão apresenta diferentes estágios de desenvolvimento. Os dois primeiros são formados durante o estágio larval conhecido como prodissoconcha I, que mede entre 115 e 117 μm , e prodissoconcha II, com 320 μm (Morton, 2015). Em seguida ocorre a formação da nepioconcha com 1300 μm e, por fim, a dissoconcha, que se desenvolve no indivíduo juvenil tornando-se a concha permanente na fase adulta (Cataldo, 2005; Morton, 2015). Apesar destas classificações, não encontramos até o momento na literatura um consenso a respeito das diferentes fases de desenvolvimento.

A espécie exibe atributos como o curto período de vida, rápido crescimento individual, maturidade sexual precoce, alta fecundidade, presença de estágio larval natante, comportamento gregário e hábito alimentar suspensívoro (Morton, 1996; Darrigran & Damborenea, 2011). A presença da larva livre natante facilita a dispersão do molusco no plâncton, permitindo que ele ocupe diferentes substratos onde os adultos sésseis se agregam através do bisso (IBAMA, 2020). Estas duas últimas características são essenciais no sucesso da invasão, aliado às atividades antrópicas que impulsionam a sua dispersão (Boltovskoy, 2015).

Os primeiros registros da espécie na América do Sul ocorreram na década de 90 no Rio da Prata (Argentina) e no Delta do rio Jacuí (Rio Grande do Sul) (Pastorino et al, 1993; Darrigran et al, 2011). Desde então, atividades de pesca, recreação embarcada e o intenso tráfego fluvial contribuem para a dispersão da espécie em diferentes bacias hidrográficas brasileiras (Darrigran & Damborenea, 2005). Atualmente é considerada uma das espécies invasoras mais agressivas causando problemas ecológicos e econômicos em corpos de água doce do Brasil (Darrigran & Damborenea, 2011; Karatayev et al, 2015; Silva et al, 2021).

Dentre os impactos econômicos gerados pela presença do mexilhão, podemos destacar a obstrução e corrosão de instalações em usinas hidrelétricas e tanques de piscicultura (Jurgens & Gaylord, 2017; Yao et al., 2017). A espécie, que possui alta

capacidade incrustante, acaba contribuindo para a contaminação ambiental devido às elevadas quantidades de produtos químicos necessários em seu controle, bem como com a diminuição da qualidade de água gerada pela mortalidade dos animais (Pereyra et al., 2011; Andrade et al., 2015; Zhang et al., 2022). Outros problemas estão relacionados com a modificação de substratos e diminuição da biodiversidade local (Paolucci et al., 2010; Darringan & Damborenea., 2011; Silva et al., 2013).

A introdução de espécies invasoras representa uma das principais ameaças à biodiversidade global (Pysek et al., 2020; Roy et al., 2023; Henriksen et al., 2024). Porém, embora estudos a respeito dos impactos ambientais e econômicos tenham sido amplamente realizados ao longo dos anos (e.g., Cuthbert et al., 2021; Gentili et al., 2021; Roy et al., 2023; Henriksen et al., 2024), aqueles envolvendo outras escalas biológicas como a fisiologia da espécie ainda são insipientes (Zerebecki & Sorte, 2011; Ornelas et al., 2020). No entanto, estudos dessa natureza são necessários, uma vez que a história de vida e as características fisiológicas das espécies desempenham importantes papéis na sobrevivência e no sucesso da invasão dessas (Boher et al., 2018). Em vista disso, caracterizar os fenótipos fisiológicos envolvidos no estabelecimento de espécies não nativas pode ampliar a compreensão a respeito da ecologia de invasão de espécies (Kelley, 2014).

OBJETIVOS E HIPÓTESE

Objetivo geral

Avaliar a tolerância térmica do mexilhão-dourado (*L. fortunei*), em diferentes estágios de desenvolvimento, (do estágio larval a adulto), bem como caracterizar as respostas dos metabólitos da via glicolítica basais e diante da exposição à temperatura de 32°C.

Objetivos específicos

- Estabelecer a temperatura letal média (TL50) para *L. fortunei* em diferentes estágios de desenvolvimento;
- Caracterizar as respostas fisiológicas basais (e.g. osmorregulatórias) de juvenis de *L. fortunei* após exposição à temperatura subletal;
- Comparar as respostas fisiológicas basais de juvenis de *L. fortunei* às respostas desses animais frente ao estresse térmico.

Hipótese

A hipótese deste trabalho é de que a tolerância térmica de *Limnoperna fortunei* varia entre os diferentes estágios de desenvolvimento, com menor tolerância térmica em estágios iniciais. Além disso, a exposição à temperatura subletal de 32°C induz alterações fisiológicas significativas.

Capítulo 1: Tolerância térmica do mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*)¹

¹ Capítulo formatado para submissão na revista Hydrobiologia

RESUMO

Limnoperna fortunei (Dunker, 1857), ordem Mytiloida e família Mytilidae é uma espécie de bivalve dulcícola invasora, originária da Ásia. Por se tratar de uma espécie invasora associada a impactos econômicos e ambientais, e como atualmente não existem métodos eficientes de controle de *L. fortunei*, é necessário conhecer seus limites de tolerância térmica nas diferentes fases de desenvolvimento para o desenvolvimento de mecanismos de controle. Nosso objetivo foi avaliar a tolerância térmica do mexilhão-dourado em cinco classes de tamanho (do estágio larval a adulto) e determinar a temperatura letal média (TL50) para cada classe avaliada. As temperaturas experimentais foram 30, 35, 40 e 50°C. A média de temperatura para o grupo controle foi de 23,32°C. Os experimentos de determinação da tolerância térmica ocorreram em um período de 60 min para as larvas e 96 h para as demais classes, sob condições estáticas. A temperatura letal média (TL50) para os mexilhões pertencentes à Classe I (Larvas) foi de 37,79°C (n=307/ml), Classe II (pós larvas) 30,44°C (n=80), Classe III (Juvenis I) 32,55°C (n=80), Classe IV (Juvenis II) 34,65 °C (n=80) e Classe V (Adultos) 34,68 °C (n=80). Não foram encontradas diferenças significativas entre as classes II, III, IV e V. Essa caracterização é uma ferramenta poderosa para prever a invasividade, pois, indica quais ambientes são propícios para sua sobrevivência e reprodução e pode ajudar no desenvolvimento de técnicas de controle mais eficazes. Sendo assim, conhecer os limites de tolerância térmica de *L. fortunei* em diferentes estágios de desenvolvimento é crucial para prever sua invasividade e aprimorar métodos de controle mais eficazes.

INTRODUÇÃO

Limnoperna fortunei (Dunker, 1857), Mollusca:Bivalvia, ordem Mytiloida e família Mytilidae, popularmente conhecido como mexilhão-dourado, é uma espécie de bivalve dulcícola invasora, originária da Ásia (Xu, 2015; Boltovskoy et al., 2022). Sua área de distribuição nativa é na bacia do Rio das Pérolas na China (Miller & McClure, 1931; Boltovskoy & Correa, 2015; Xu, 2015), porém, a espécie se dispersou por diferentes bacias ao redor do mundo e, atualmente, está estabelecida como invasora em Hong Kong, Taiwan, Japão e América do Sul (Silva et al., 2021). O primeiro registro de ocorrência na América do Sul foi no ano de 1991, no rio da Prata, Argentina (Pastorino, 1993), onde avançou em uma velocidade de 240 km por ano (Darrigan & Ezcurra de Drago, 2000). No fim de 1998, adentrou o Brasil, sendo encontrada, inicialmente, no Rio Guaíba (RS) (Mansur, 2003). Atualmente, das doze bacias hidrográficas brasileiras, sete são impactadas pela presença do mexilhão-dourado (Silva et al., 2021).

Esse bivalve é considerado a espécie invasora que mais gera impactos no país, e a que se espalhou mais rapidamente pelos reservatórios brasileiros (1,68 reservatórios/ano) (Miyahira, 2020; Silva et al, 2021). A combinação de fatores como o aumento da conectividade entre bacias, construção de reservatórios e navegação em águas continentais impulsionaram sua distribuição (Boltovskoy, 2015). A espécie habita águas de fluxo relativamente lento, formando aglomerados de indivíduos que se agrupam através de uma estrutura proteica denominada bisso (Morton, 2015). Esta característica permite que os indivíduos se fixem em diferentes superfícies naturais e artificiais (Darrigan e Damborenea, 2009). Além disso, exibe atributos que favorecem o seu sucesso como uma espécie invasora sendo eles o curto período de vida, rápido crescimento individual, rápida maturidade sexual, alta fecundidade, grande capacidade de colonizar diferentes habitats, ampla faixa de tolerância fisiológica e associação com alguma atividade humana (Morton, 1996).

Limnoperna fortunei possui alto potencial incrustante e acaba sendo um problema prevalente em usinas hidrelétricas devido a obstrução e corrosão de instalações (Morton, 1975; Jurgens & Gaylord, 2018; Yao et al, 2017). No Brasil, 40% das usinas hidrelétricas, que representam 55% da capacidade de geração de energia no país, encontram-se afetadas (Rebelo, 2018) por um ou mais dos problemas relacionados com a presença de mexilhão-dourado. Além dos problemas econômicos,

L. fortunei gera problemas ecológicos como, por exemplo, a contaminação do ambiente aquático por produtos químicos utilizados em seu controle (Pereyra et al, 2012; Andrade et al, 2015; Zhang et al, 2022) a modificação de substratos pelo aumento da matéria orgânica através da liberação de pseudofeces e alteração da dinâmica de luz nos corpos hídricos a partir do processo de filtração, o que pode culminar em diminuição da biodiversidade local (Mansur et al, 2003; Borthagaray e Carranza, 2007; Sylvester et al, 2005; Karatayev et al, 2007; Darrigran e Damborenea, 2011; Silva et al, 2013).

Corroborando o fato de a espécie apresentar ampla plasticidade fisiológica, *L. fortunei* mostra-se capaz de tolerar temperaturas que variam de 5 a 47,3°C variando entre as classes de tamanho (Perepelizin & Boltovskoy, 2011 a;b; Spaccesi, 2013; Cataldo, 2015; Duchini et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Ernandes-Silva et al., 2016; Andrade et al., 2018; De Andrade et al., 2021; Ayroza et al., 2021; Fabian et al., 2021; Paolucci & Thuesen, 2022; Somma et al., 2021; Xia et al., 2021; Boltovskoy et al., 2022; Yang et al., 2023)). No entanto, apesar da temperatura elevada ser um fator limitante à distribuição de espécies no ambiente natural, as estações mais quentes (primavera/verão) favorecem a abundância e o desenvolvimento larval de *L. fortunei* (Ernandes-Silva et al., 2016; Ernandes-Silva et al., 2017; Ayroza et al., 2021; Boltovskoy et al., 2022; Somma et al., 2021).

Apesar de diversos estudos terem avaliado a sobrevivência e abundância larval dessa espécie em diferentes temperaturas (Perepelizin & Boltovskoy, 2011 a;b; Spaccesi, 2013; Cataldo, 2015; Duchini et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Ernandes-Silva et al., 2016; Ernandes-Silva et al., 2017; Andrade et al., 2018; De Andrade et al., 2021; Ayroza et al., 2021; Boltovskoy et al., 2022; Fabian et al., 2021; Paolucci & Thuesen, 2022; Somma et al., 2021;; Xia et al., 2021), até o presente momento não foram encontrados estudos que tenham avaliado os limites de tolerância térmica para a espécie, em especial, para os diferentes estágios de desenvolvimento (larval ao adulto). Sabe-se que os estágios iniciais da vida de um organismo podem apresentar tolerância inferior ao aumento da temperatura, ao passo que indivíduos juvenis e adultos tendem a possuir limites de tolerância superiores (Miller et al., 2013). Do mesmo modo, o aumento da temperatura pode resultar em alterações na homeostasia do organismo interferindo nas transições ocorridas em diferentes estágios de desenvolvimento (Fields, 2011; Truebano et al., 2018), portanto, o aumento da temperatura poderia ser um elemento empregado no controle da espécie. Diante

disso, conhecer os limites de tolerância de uma espécie invasora e, em diferentes classes de desenvolvimento, pode ampliar o conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos em um processo de invasão. Além disso, conhecer os limites pode auxiliar na utilização de métodos de controle antes a pós o processo de invasão.

Assim, como se trata de uma espécie invasora associada a impactos econômicos e ambientais e, como atualmente não existem métodos eficientes para o controle de *L. fortunei*, é necessário conhecer seus limites de tolerância térmica em diferentes estágios de desenvolvimento. Essa caracterização é uma ferramenta poderosa para prever a invasividade e pode auxiliar no desenvolvimento de técnicas para controlar a espécie de forma mais eficaz.



Figura 1. Agregado de mexilhões unidos através do bisso

MATERIAL E MÉTODOS

Classificação dos animais

Os animais foram classificados de acordo com a classe de tamanho, sendo elas: classe I que correspondeu às larvas (micrômetros), classe II que correspondeu às pós-larvas (0,3 até 0,7mm), classe III que correspondeu aos juvenis I (>0,7 até 1cm), classe IV que correspondeu aos juvenis II (>1 até 2cm) e classe V que corresponde aos adultos (2 até 3cm).

Coleta, manutenção e experimentação com larvas de *L. fortunei*

As amostras de larvas de *L. fortunei* foram obtidas através da filtragem da água bruta do sistema de resfriamento da Usina Hidrelétrica de Jupia, na cidade de Três Lagoas, MS (-20.781961201204023, -51.633460646618495) no mês de abril de 2023. A filtragem da água foi realizada com rede de zooplâncton de 68 µm durante 1 h. Após filtragem, a amostra foi concentrada em 100 ml de água do local, sendo mantida no laboratório, sob aeração constante. Os dados de temperatura, oxigênio dissolvido, sólidos totais, salinidade e turbidez da água do local de coleta foram obtidos com a utilização da sonda ProQuatro (YSI®) e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros abióticos da água bruta coletada no ponto de filtragem para obtenção das larvas de mexilhão-dourado

Temperatura (°C)	Oxigênio Dissolvido (%)	Oxigênio Dissolvido (mg/l)	pH	Sólidos totais (mg/l)	Salinidade (‰)	Turbidez (NTU)
26,55 ± 0,15	92,45 ± 0,65	7,42 ± 0,07	7,72 ± 0,02	105,70 ± 0,40	0,08 ± 0,01	1,13 ± 0,01

Dados apresentados como média ± erro padrão da média

Para a avaliação da condição do zooplâncton e quantidade de larvas, uma alíquota da amostra (1 mL) foi observada em microscópio óptico. Adicionalmente, uma alíquota (1 mL) foi mantida em um béquer sem oxigenação e monitorada durante 2 horas para avaliação da viabilidade das larvas diante da ausência de oxigênio. Noventa e cinco (95%) das larvas permaneceram viáveis/vivas ao longo do período monitorado (25°C). A partir do teste de viabilidade o período experimental foi estabelecido em 1 hora, no intuito de garantir a sobrevivência das larvas durante todo o experimento de tolerância térmica. Durante o teste de viabilidade das larvas e os

experimentos, não foi utilizado aeração, isto porque, impossibilitaria a contagem das larvas pela presença de bolhas.

Para realização dos testes de tolerância térmica apenas as larvas no estágio de véliger de charneira reta (Figura 2) foram utilizadas, por ser o estágio encontrado em maior número nas amostras. Uma alíquota de 1 mL da amostra de água contendo, em média, 307 larvas foi utilizada no experimento, de modo a viabilizar a contagem das larvas em intervalos de 20 minutos.

A alíquota de água (1 mL) foi colocada em béqueres de 50 mL e esses mantidos a temperatura ambiente (condição controle) ou nas temperaturas de 30, 35, 40 e 50°C (condições experimentais). Os béqueres experimentais foram colocados em banho-maria com controle digital da temperatura. Tanto os testes de exposição à temperatura ambiental quanto os experimentais foram realizados em duplicatas.

A contagem das larvas correspondentes às condições controle e experimentais foi realizada em microscópio estereoscópico (Olympus® SZ2 - LIST) sobre uma folha quadriculada adaptada a área da luz inferior do equipamento. A contagem foi realizada com 20, 40 e 60 minutos de experimentação. A amostra foi avaliada de modo que todas as larvas existentes fossem contabilizadas. A mortalidade nas condições controle e experimentais foi calculada na forma de porcentagem em relação ao total de larvas presentes nas amostras de cada uma das condições. Deste modo, os dados utilizados na alimentação do software utilizado para o cálculo da temperatura letal média (TL 50%) para as larvas correspondem à média obtida entre as duplicatas de cada uma das condições controle e experimentais.

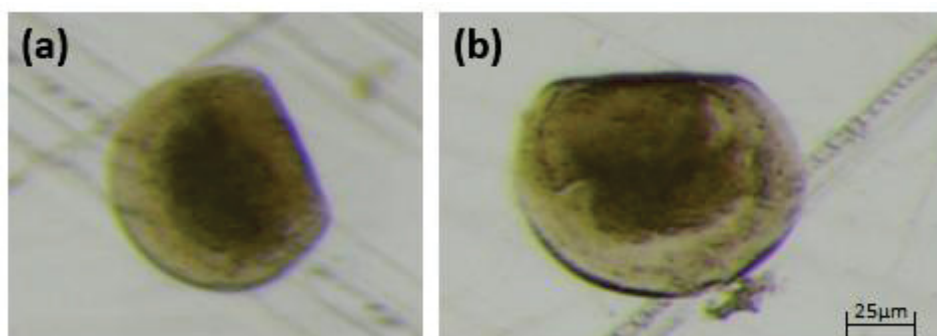


Figura 2. (a,b) Larva de *L. fortunei* em estágio Véliger de Charneira Reta (aumento 40 vezes = 25 μm).

Coleta, manutenção e experimentação com os demais estágios de desenvolvimento de *L. fortunei*

Os exemplares de mexilhão-dourado das classes de tamanho (pós-larvas, juvenis I, juvenis II e adultos) foram obtidos no reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu, Foz do Iguaçu/PR (-25.407059291083062, -54.5947444751121) no período de agosto/2022 a maio/2023. Durante a coleta foram obtidos dados de temperatura do ar, temperatura da água, oxigênio dissolvido, condutividade, salinidade, pH, turbidez (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros abióticos medidos no ponto de amostragem de mexilhão-dourado, barragem da Usina Hidrelétrica de Itaipu, Foz do Iguaçu/PR

Temperatura (°C)	Oxigênio Dissolvido (mg/l)	pH	Sólidos totais (mg/l)	Salinidade (‰)	Turbidez (NTU)
26,99 ± 4,16	8,45 ± 0,93	8,02 ± 0,17	124,00 ± 0,00	0,06 ± 0,02	0,76 ± 0,04

Dados apresentados como média ± erro padrão da média

Os animais foram capturados manualmente e colocados em recipientes plásticos contendo água do local de coleta (~15 L) e aeração constante, onde permaneceram até serem transportados (por aproximadamente 10 h) ao Laboratório de Toxicologia e Avaliação Ambiental – LabTAA (LACTEC), em Curitiba/PR. Apenas os animais das demais classes foram transportados, já que os experimentos com as larvas foram realizados na própria usina. Ao longo do transporte 50% da água do recipiente foi substituída após ~ 5 h de viagem, afim de reduzir a concentração de amônia excretada na água. No laboratório, os animais foram lavados duas vezes com água do local de coleta e transferidos para aquários de aclimação (74 L) contendo 50% água decolorada e 50% água do local de coleta, filtração e aeração constante. Os aquários de aclimação foram mantidos em sala climatizada (22±0,18°C e 66±1,50%; Termo-higrômetro Digital Akso - Ak28®). Diariamente (manhã/tarde), eram monitorados os dados abióticos dos aquários: pH, temperatura, condutividade, salinidade, sólidos totais dissolvidos (Medidor Multiparâmetros Akso®), cloro total livre (Cloro Tester Akso®), iluminância (Luxímetro Akso – Ak 305), amônia total (Kit Labcon Test Água Doce: Determinação de Amônia - ALCON®), nitrito (Kit Labcon Test Água Doce: Determinação de Nitrito - ALCON®) e dureza (Kit Labcon Test Água Doce: Dureza em carbonatos KH – ALCON®). A média dos parâmetros medidos durante o período de aclimação é apresentada na Tabela 3. Os filtros foram higienizados diariamente.

Caso necessário, 30% do volume era trocado por água doce decolorada e os parâmetros abióticos ajustados através da adição de soluções acidificantes (HCl 1M) ou alcalinizantes (NaOH 1M) e neutralizadora de amônia (AmGuard, Seachem®). Os animais eram alimentados diariamente com ~10 g de alimento comercial triturado, a base de Spirulina (Veggie Flakes Nature, Sera marine®). A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início da experimentação.

Tabela 3. Parâmetros abióticos determinados nos aquários de aclimação.

pH	Temp. (°C)	Dur (°dH)	NH ₃ total (ppm)	NH ₃ tóxica (ppm)	NO ₂ ⁻ (ppm)	Cl total livre (ppm)	Salin (ppm)	Condut. (uS/cm)	Ilumin (lux)	Sól.Totais (mg/l)
6,9±0,04	22,0±0,19	3,3±0,19	3,2±0,24	0,015±0,001	2,1±0,12	0,5±0,05	167,4±8,38	334,9±16,77	192,7±5,66	171,7±8,85

Dados apresentados em média ± erro padrão da média

Para a realização dos experimentos, os animais foram separados e submetidos às baterias experimentais conforme as diferentes classes de tamanho. A classificação foi definida a partir da composição estrutural comumente observada nas populações dos indivíduos em campo. As classes de tamanho definidas para os experimentos encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Média do tamanho dos mexilhões (cm) de cada classe em cada temperatura testada

		Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V
30°C	Controle	0,53±0,03	0,76±0,03	1,43±0,04	2,70±0,03
	Experimental	0,43±0,03	0,82±0,03	1,42±0,03	2,81±0,05
35°C	Controle	0,58±0,02	0,94±0,01	1,94±0,02	2,89±0,04
	Experimental	0,57±0,03	0,90±0,02	1,91±0,02	2,94±0,06
40°C	Controle	0,65±0,01	0,81±0,02	1,78±0,04	2,35±0,06
	Experimental	0,65±0,01	0,89±0,03	1,81±0,05	2,35±0,06
50°C	Controle	0,68±0,01	0,94±0,01	1,78±0,04	2,39±0,03
	Experimental	0,67±0,02	0,94±0,02	1,50±0,01	2,88±0,04

Dados apresentados como média ± erro padrão da média

Minutos antes do início dos experimentos um agregado de mexilhões foi removido do aquário de aclimação e os indivíduos separados, através do corte dos biscoos, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Os animais selecionados eram mantidos em um béquer (500 mL) contendo água do aquário de aclimação para posterior medição da concha (paquímetro digital, Absolute Mitutoyo®). A média de tamanho dos animais utilizados nos experimentos, de acordo com cada classe de

tamanho, está apresentada na Tabela 5. Após serem medidos, dez indivíduos (n=10) de cada classe de tamanho eram alocados individualmente em béqueres de vidro contendo 100 mL de água decolorada, com aeração constante e fotoperíodo natural. Os animais foram expostos a temperatura ambiente (condição controle) ou às temperaturas de 30, 35, 40 e 50°C (condições experimentais) por 96 horas. Os aquários experimentais foram mantidos em banho-maria com controle digital da temperatura (Figura 3).



Figura 3. Animais em aquários individuais, submetidos às condições controle (A e B) e experimentais (C e D)

Tabela 5. Média dos parâmetros abióticos (temperatura e amônia) determinada em cada uma das condições (controle - CT e experimental - EXP) experimentais

		Classe II		Classe III		Classe IV		Classe V	
		CT	EXP	CT	EXP	CT	EXP	CT	EXP
30°C	amônia total (ppm)	0,66±0,08	0,89±0,23	0,62±0,08	0,70±0,08	1,00±0,16	1,20±0,28	0,52±0,15	1,26±0,32
	temperatura (°C)	26,8±0,05	29,7±0,02	20,2±0,05	29,0±0,15	23,7±0,04	29,5±0,05	24,1±0,02	29,7±0,05
35°C	amônia total (ppm)	0,32±0,06	0,45±0,12	0,44±0,16	0,78±0,04	0,67±0,25	1,00±0,08	0,42±0,11	2,05±0,44
	temperatura (°C)	22,6±0,03	34,5±0,15	21,1±0,03	34,1±0,13	23,0±0,03	34,3±0,10	23,2±0,06	34,4±0,11
40°C	amônia total (ppm)	0,12±0,02	0,16±0,04	0,10±0,02	0,46±0,07	0,16±0,02	1,88±0,46	0,37±0,05	2,73±0,64
	temperatura (°C)	22,4±0,11	39,0±0,21	24,0±0,02	39,1±0,14	22,4±0,11	39,2±0,11	22,4±0,10	39,4±0,12
50°C	amônia total (ppm)	0,05±0,01	0,07±0,01	0,09±0,01	0,10±0,02	0,12±0,04	0,06±0,03	0,12±0,05	0,16±0,02
	temperatura (°C)	22,3±0,15	49,1±0,18	22±0,17	49,3±0,09	23,9±0,09	49,7±0,09	23,1±0,05	49,7±0,11

Dados apresentados como média ± erro padrão da média

A mortalidade e os parâmetros abióticos (concentração de amônia total e temperatura) foram determinados em cada um dos aquários a cada 24 horas. Os

animais foram considerados mortos quando as valvas permaneciam abertas e quando não respondiam ao estímulo de toque, realizado com uma agulha de insulina. A concentração de amônia total foi determinada pelo método de Verdouw (1978). A temperatura foi mensurada com termômetro digital de pistola (Termômetro digital infravermelho, ICEL®). A média dos dados para todos os parâmetros são apresentados na *Tabela 6*.

Tabela 6. Temperaturas letais (TL; °C) determinadas para 10, 50, 90 e 99% das larvas de mexilhão-dourado (L. fortunei) expostas por 60 min a temperaturas entre 30 e 50°C

Temperatura letal (TL, °C)	
TL 10 – 60 min	36,02 (32,89 – 37,26)
TL 50 – 60 min	37,79 (35,96 – 38,58)
TL 90 – 60 min	39,64 (38,92 – 40,35)
TL 99 – 60 min	41,22 (40,47 – 42,93)

Os dados entre parênteses correspondem aos intervalos de confiança de 95%

Análises Estatísticas

Os dados de temperatura letal (TL) são apresentados como médias acompanhados do intervalo de confiança (95%). Os demais parâmetros são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). As temperaturas letais para 10, 50, 90 e 99% dos mexilhões testados, em cada uma das classes de tamanho, foram calculadas através da análise Probit (Finney, 1978). Nos poucos casos em que a mortalidade ocorreu nos controles, os dados experimentais foram corrigidos conforme descrito por Sprague (1969), antes de serem submetidos aos testes. Para verificar a diferença entre as curvas de sobrevivência foi utilizado o teste de Kaplan-Meyer e Log-Rank/Mantel-Cox no Graphpad Prisma 5.0 (Kleinbaum & Klein, 1997). Os gráficos de sobrevivência das larvas e demais classes de tamanho foram produzidos com o software SigmaPlot 14.0.

RESULTADOS

Experimentos de tolerância térmica com larvas de *L. fortunei*

As larvas expostas às temperaturas experimentais de 30°C e 35°C, por 60 min, apresentaram taxa mortalidade de 20% e 12%, respectivamente. Quando submetidas a 40°C as larvas apresentaram 50% de mortalidade após 20 min e 95% de mortalidade após 60 min. As larvas expostas a 50°C atingiram 100% de mortalidade após 20 min (Figura 4). A mortalidade das larvas submetidas à condição controle variou entre 1.25% e 29% ao longo dos 60 min de experimento. A temperatura letal média (TL50) para as larvas de mexilhão-dourado expostas por 60 min às temperaturas testadas foi 37.79°C. A temperatura média para mortalidade de 10% das larvas foi de 36.02°C, para mortalidade de 90% das larvas foi de 39.64°C e para 99% das larvas foi de 41.22°C.

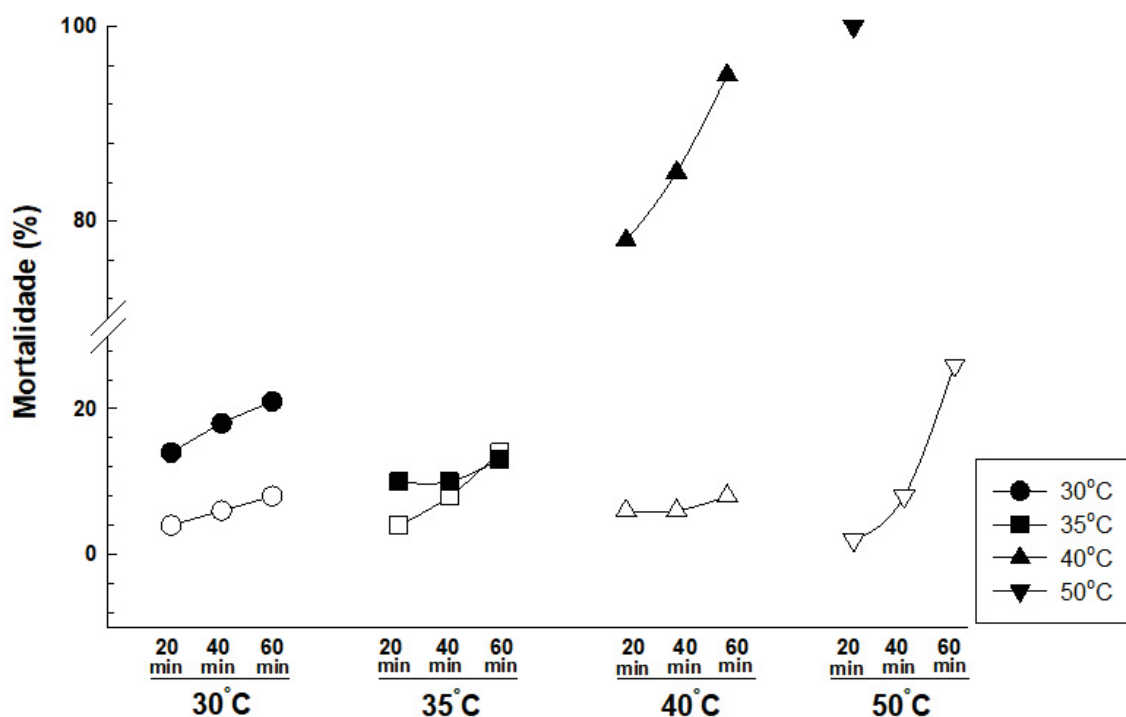


Figura 4. Mortalidade de larvas (%) em cada temperatura testada (C°) em 20, 40, 60 min. Simbolos vazados correspondem a temperatura ambiente e simblos preenchidos correspondem a temperatura experimental.

Experimentos de tolerância térmica com pós-larvas, juvenis e adultos de *L. fortunei*

As temperaturas letais para pós-larvas, juvenis e adultos de *L. fortunei* foram determinadas através de experimentos com 96 horas de duração (Figura 5). A maior taxa de mortalidade (30%) foi observada nos indivíduos da classe II (pós-larvas)

expostos a 30°C. A classe III (juvenis I) apresentou apenas 10% de mortalidade em 30°C, enquanto que nas demais classes não houve mortalidade. A temperatura de 35°C causou a mortalidade de 100% dos indivíduos da classe II, 90% da classe III (juvenis I) e 70% para a classe IV (juvenis II) e V (adultos) após 96 horas. A exposição às temperaturas de 40 e 50°C por 96 horas resultou em 100% de mortalidade dos animais de todas as classes de tamanho. A temperatura letal média estabelecida para a classe II (pós larvas) foi de 30.44°C; classe III (juvenis I) 32.55°C; classe IV (juvenis II) 34.65°C e, para a classe V (adultos) 34.68°C (Tabela 7). Não foram encontradas diferenças significativas entre as classes II, III, IV e V.

Tabela 7. Temperaturas letais (TL; °C) determinadas para 10, 50, 90 e 99% dos mexilhões-dourados (L. fortunei) expostos, por 96h, a temperaturas entre 30 e 50°C

Temperatura Letal (TL; °C)				
	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V
TL _{10-96h}	29,56 (28,94 – 30,20)	30,25 (25,53 – 31,90)	33,77 (33,45 – 34,41)	33,92 (33,45 – 34,41)
TL _{50-96h}	30,44 (29,80 – 31,10)	32,55 (30,24 – 34,36)	34,65 (34,20 – 35,18)	34,68 (34,20 – 35,18)
TL _{90-96h}	31,35 (30,68 – 32,02)	35,02 (33,37 – 39,73)	35,54 (34,96 – 35,97)	35,46 (34,96 – 35,97)
TL _{99-96h}	32,11 (31,42 – 32,81)	37,18 (34,99 – 46,20)	36,29 (35,60 – 36,63)	36,11 (35,60 – 36,63)

Os dados entre parênteses correspondem aos intervalos de confiança de 95%

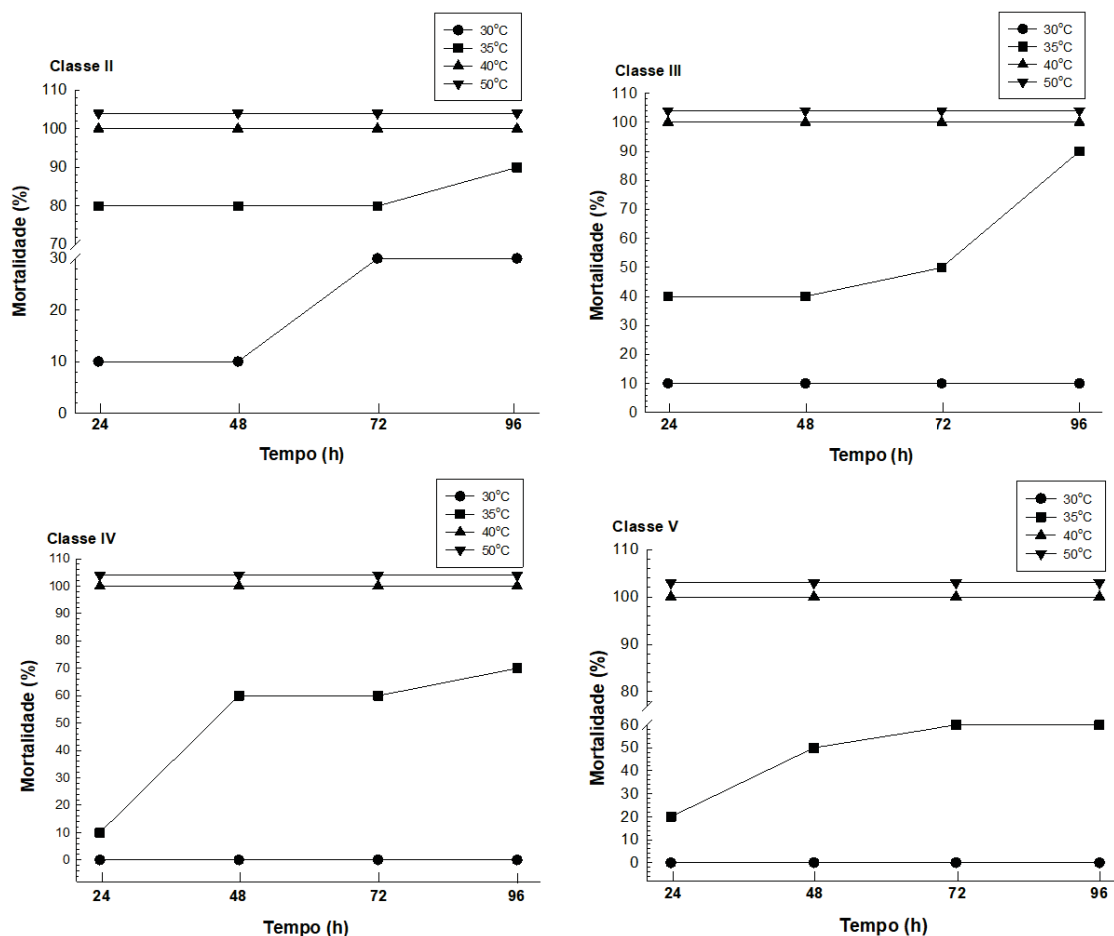


Figura 5. Mortalidade (%) das classes II (Pós larvas), III (Juvenis I), IV, (Juvenis II) e V (Adultos) em cada temperatura testada (C°)

DISCUSSÃO

A temperatura desempenha um papel crucial na sobrevivência dos seres vivos influenciando a fisiologia, comportamento e abundância desses (Franks & Hoffmann, 2012; Perepelizin & Boltovskoy, 2015; Alfonso & Sadoul, 2021; Fernández et al., 2022; Bonacina et al., 2023; Gosh et al., 2024). Devido a isso, é considerada uma variável importante no processo de dispersão podendo atuar como um fator limitante para a distribuição das espécies (Sunday et al., 2012; Rutterford et al., 2015; Campana et al., 2020), especialmente em ambientes aquáticos, onde os processos de reprodução, desenvolvimento e sobrevivência das populações são determinados por este fator (Perepelizin & Boltovskoy, 2015; Rutterford et al., 2015; Campana et al., 2020; Fernández et al., 2022).

Espécies invasoras, como o mexilhão-dourado, são capazes de ocupar e sobreviver em ambientes com grandes variações abióticas, consequentemente, possuem facilidade em se estabelecer em novos ambientes (Kelley, 2014). No entanto, apesar da relevância dessa informação, nenhum estudo, até o momento, havia determinado a tolerância térmica do mexilhão-dourado em suas diferentes classes de tamanho. No presente estudo, a temperatura letal média determinada para as larvas foi de 37.79°C (35.96-38.58) enquanto para as demais classes de tamanho variou entre 30.44°C e 34.68°C. Embora este resultado sugira maior tolerância térmica das larvas é importante reforçar que o tempo de experimento dessas foi de apenas 60 min. Portanto, as larvas demonstraram maior sensibilidade ao aumento da temperatura, corroborando dados previamente apresentados na literatura como os encontrados para a ostra *Pinctada margaritifera* (Lugue et al., 2024) e para o bivalve *Spisula solidissima* (Roosenburg et al., 1984). Isso indica que, ao contrário dos indivíduos adultos, as larvas são altamente suscetíveis a alterações nas condições físicas do ambiente, incluindo a temperatura (Rayssac et al., 2010; Masanja et al., 2023).

Os testes foram realizados com larvas no estágio véliger de charneira reta que já apresentam valvas. Observou-se que embora as valvas ofereçam proteção, esta não foi suficiente para proteger os animais dos efeitos do aumento da temperatura. Isso pode ter ocorrido porque é nessa fase que se desenvolvem os órgãos internos, manto e pé (Ramli et al., 2022) ou seja, durante a transição das fases larvais, ocorrem mudanças na morfometria da concha e reorganizações anatômicas que exigem gastos metabólicos (Sprung & Widdows, 1986; Schneider et al., 2003). A presença do estressor térmico provavelmente alterou as atividades metabólicas, realocando a demanda energética e, consequentemente, desencadeou alteração da homeostasia dos animais inviabilizando sua sobrevivência (Schneider et al., 2003). Deste modo, embora a estrutura da concha possa mitigar estresses abióticos (dissecação, radiação UV e choque osmótico), a sua capacidade protetora possui limites de tolerância (Zippay & Hofmann, 2010). Isto porque a proteção conferida pela concha depende do aumento de sua espessura que ocorre à medida que o molusco se desenvolve (Bondarev et al., 2013).

Além disso, como as larvas se desenvolvem em ambientes termicamente estáveis, esta fase exibe menor tolerância térmica em relação a indivíduos adultos que vivem em ambientes mais variáveis (Truebano et al., 2018). Por serem mais

sensíveis, as larvas podem constituir a fase ideal para utilização de mecanismos de controle, já que a sobrevivência da larva planctônica é essencial para a colonização (Oliveira, 2010). Assim, compreender esta informação é fundamental para a detecção precoce e monitoramento da colonização do mexilhão-dourado (Cataldo, 2015). Outro aspecto relevante é que durante o experimento não foi possível incluir a oxigenação, isto influencia no experimento assim como, o aumento da temperatura que compromete a disponibilidade de oxigênio.

No que diz respeito aos limites de tolerância térmica entre as classes II, III, IV e V em cada temperatura, não foram encontradas diferenças significativas ($p=0.0992$ para 30°C / $p=0.1325$ para 35°C / $p=1.000$ para 40°C / $p=1.000$ para 50°C). Esses resultados corroboram os encontrados em outros dois estudos que avaliaram pós-larvas (6mm) e juvenis II (20mm) submetidos ao aumento gradativo da temperatura (12 a 51°C) (Perepelizin & Boltovskoy, 2011a) e entre pós-larvas (7 mm) e adultos (21 mm) (Perepelizin & Boltovskoy 2011b) expostos a 34, 36, 38, 40, 41, 42 e 43°C gradativamente ($0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Porém, apesar da ausência de diferença entre a tolerância térmica das diferentes classes de tamanho, a temperatura letal média variou de $30,4^{\circ}\text{C}$ a $34,6^{\circ}\text{C}$. Essa variação é relevante, pois, pode indicar que *L. fortunei* dispõe de mecanismos fisiológicos que o permite tolerar uma ampla faixa de aumento da temperatura. No entanto, novos estudos que avaliem mecanismos fisiológicos da espécie precisam ser desenvolvidos para melhor compreensão dessa capacidade.

De qualquer modo, sabe-se que em indivíduos pós larvas, juvenis e adultos, o hábito gregário e o fechamento das valvas são comportamentos importantes em condições de oscilação de temperatura (Dowd & Somero, 2013; Jurgens & Gaylord, 2018; Miller & Dowd, 2019), uma vez que mitigam os efeitos fisiológicos destas mudanças, permitindo um equilíbrio entre o ganho e a perda de calor (Majansa, 2023). As agregações densas, formadas através do fio bissal, proporcionam um micro-habitat que retém a umidade e mantém o conforto térmico dos animais no ambiente (Jurgens & Gaylord, 2018). Sendo assim, a presença da concha é um atributo importante para a tolerância térmica do mexilhão-dourado e pode ter contribuído para a tolerância da espécie frente aos desafios impostos.

Sabe-se, ainda, que temperaturas entre 26 e 28°C criam condições favoráveis para a sobrevivência do mexilhão-dourado (Cataldo, 2015). De fato, a maior parte das bacias hidrográficas brasileiras são consideradas propícias para a ocupação de *L. fortunei* (Oliveira et al., 2010) uma vez que apresentam temperaturas que variam entre

25°C e 29°C, bem como outras condições que favorecem a sobrevivência da espécie, como um pH entre 5.7 e 9.0 e concentração de cálcio >1.8 mg/L, importante para o crescimento das conchas (Oliveira et al., 2010). Corroborando essa informação, atualmente as áreas ocupadas pelo mexilhão-dourado estão predominantemente nas regiões centro-sul do Brasil, onde as temperaturas podem variar entre 22 e 27°C (Pertsch et al., 2021; Brasil das águas, 2013). No entanto, há o temor de que as mudanças climáticas favoreçam o crescimento populacional e a expansão da espécie para novas áreas, em especial a bacia Amazônica, uma vez que a espécie já ocorre no rio Cuiabá que está próximo (150 km) da bacia do rio Tapajós onde a temperatura média é 27,6°C (Boltovskoy, 2015; WWF, 2024). O processo de invasão pode resultar em um aumento na competição entre espécies nativas e invasoras e, dado os impactos ecológicos e econômicos que *L. fortunei* pode causar, há elevado risco à integridade dos ecossistemas aquáticos e à biodiversidade da Amazônia (Simberloff et al., 2013).

Porém, embora a temperatura favoreça a dispersão do mexilhão-dourado e seja um fator de preocupação para as bacias ainda não atingidas é sabido que a temperatura letal média para a espécie ficou em 34°C e que temperaturas a partir de 40°C são incompatíveis com a sobrevivência dos indivíduos. Dessa forma, embora esse não seja o único fator que controla a dispersão da espécie em seu ambiente natural, os resultados apresentados demonstram que o aumento da temperatura pode ser um fator limitante para a espécie e, em espaços controlados, como instalações industriais, pode ser empregado como um método de controle (Perepelizin & Boltovskoy, 2011 a; b) ajudando a reduzir o processo de incrustação e outros efeitos gerados pela espécie em diferentes superfícies. Assim, conhecer as respostas fisiológicas do mexilhão-dourado ao aumento da temperatura pode permitir que estratégias sejam desenvolvidas para mitigar os seus impactos como uma espécie invasora. Esta estratégia não apenas ajudaria a limitar a proliferação da espécie, mas também poderia contribuir para a conservação da biodiversidade local e a proteção dos ecossistemas aquáticos.

**Capítulo 2: Avaliação fisiológica de
Limnoperna fortunei (Dunker, 1857) ao aumento
da temperatura**

RESUMO

A temperatura é uma das principais variáveis abióticas que afetam a dinâmica da vida nos ecossistemas aquáticos. Considerando que a temperatura é um fator chave na sobrevivência das espécies, o aumento desta representa um fator de estresse para diferentes organismos. Sabendo disso, espécies aquáticas invasoras em geral, são menos afetadas por aumento da temperatura ambiental do que espécies nativas, o que torna uma vantagem competitiva em ambientes aquáticos aquecidos, facilitando a sua proliferação e impacto sobre as espécies nativas. O mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) é um bivalve de água doce originário do sudeste asiático que se estabeleceu como uma das espécies invasoras de maior preocupação no Brasil. A ocorrência da espécie contribui para uma série de impactos econômicos e ecológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas de *L. fortunei* diante do aumento da temperatura, na tentativa de elucidar os mecanismos de tolerância e sobrevivência do mexilhão-dourado. Foram realizados experimentos com indivíduos juvenis II e adultos expostos duração de 96h horas a uma temperatura subletal de 32°C. Os indivíduos sobreviventes foram retirados do experimento e tiveram amostras de hemolinfa e tecido coletadas para análises de concentração de íons e atividade enzimática, respectivamente. Os animais expostos a 32°C apresentaram aumento significativo na concentração de lactato tanto na hemolinfa ($p=0,023$), quanto na água da cavidade do manto ($p=0,014$), em relação ao grupo controle. Houve diferenças significativas na concentração de Cl^- na hemolinfa no grupo experimental em relação ao controle ($p=0,028$), enquanto não houve diferenças significativas nos níveis de magnésio, cálcio, potássio e osmolalidade. O grupo experimental apresentou alterações nos filamentos branquiais, como dilatação do seio hemolinfático e vacuolização epitelial. A exposição subletal a 32°C induz alterações metabólicas significativas, sem causar desequilíbrios osmo-iônicos, indicando tolerância ao estresse térmico.

INTRODUÇÃO

A temperatura é uma das principais variáveis abióticas que afetam a dinâmica da vida nos ecossistemas aquáticos (Somero, 2002; Kelley, 2014; Bonacina et al., 2022). O aumento de temperatura nos limites de tolerância de um organismo, pode alterar processos biológicos como taxas de alimentação, taxas de filtração, eficiência de absorção e causar a solubilidade de gases como oxigênio, além de resultar em alterações nos processos fisiológicos, afetando a vascularização de tecidos, manutenção da composição da concha no caso dos bivalves, regulação do pH, estresse oxidativo, funcionamento do sistema imune e do metabolismo (Mazeaud, 1981; Ungell et al., 1984; Dallas & Gillespie, 2015; Cardoso et al., 2019; Adamski et al., 2022; Bonacina et al., 2022; Regino et al., 2022; Xu & Wang., 2022; Guo et al., 2023; Masanja et al., 2023; Murano., 2023; Farias et al., 2024).

Considerando que a temperatura é um fator chave na sobrevivência das espécies (Somero, 2002; Willmer et al., 2004; Adamski et al., 2022), o aumento desta representa um fator de estresse para diferentes organismos (Sanders, 2008). Nesse contexto, a compreensão das respostas fisiológicas dos seres vivos em condições de estresse é fundamental, pois estas respostas atuam como importantes indicadores de alterações fisiológicas (Boff & Oliveira, 2021), inclusive comprometendo a sobrevivência dos bivalves (Masanja et al., 2023; Raymond et al., 2024; Gordillo et al., 2025).

No entanto, os organismos possuem estratégias fisiológicas que os permitem se ajustar às situações adversas para atingir e/ou manter a homeostase (Blewett et al., 2022), em especial, em ambientes como corpos de água doce, que são suscetíveis à grandes variações térmicas (Morash et al., 2020). Tal ajuste é crucial, especialmente em organismos termoconformadores como os mexilhões, em que os processos são limitados pela temperatura da água (McMahon and Bogan 2001; Ganser et al., 2013). Sabendo disso, espécies aquáticas invasoras, em geral, são menos afetadas por aumento da temperatura ambiental do que espécies nativas (Sorte et al., 2013), o que torna uma vantagem competitiva em ambientes aquáticos aquecidos, facilitando a sua proliferação e impacto sobre as espécies nativas (Kelley, 2014).

O mexilhão-dourado (*Limnoperna fortunei*) é um bivalve de água doce originário do sudeste asiático que se estabeleceu como uma das espécies invasoras de maior preocupação no Brasil (Moutinho, 2021; Boltovskoy et al., 2022). Sua primeira

aparência no país ocorreu no final de 1998, no Rio Guaíba (Rio Grande do Sul) e, desde então, a espécie se espalhou rapidamente, afetando sete das doze bacias hidrográficas brasileiras (Miyahira, 2020; Silva et al., 2021). Essa espécie exótica possui atributos que favorecem a invasão, como a presença de estágio larval natante, comportamento gregário e associação com atividades humanas (Darrigran & Damborenea, 2011; Boltovskoy, 2015), além de apresentar hábito gregário e alta capacidade de incrustação. Devido a isso, afetam diversas infraestruturas como, por exemplo, usinas hidrelétricas e tanques de piscicultura causando impactos econômicos bastante significativos (Morton, 1975; Jurgens & Gaylord, 2017; Yao et al., 2017). Além disso, a ocorrência da espécie contribui para uma série de impactos ecológicos, seja pela poluição causada pelos produtos químicos utilizados em seu controle, pela redução da qualidade da água em decorrência da sua mortalidade (Pereyra et al, 2011; Andrade et al., 2015; Zhang et al., 2022) ou, ainda modificação de substratos pelo aumento da matéria orgânica a partir da liberação de pseudofeces, alteração da dinâmica de luz nos corpos hídricos pela filtração, o que pode acarretar na diminuição da biodiversidade local (Mansur et al, 2003; Borthagaray e Carranza, 2007; Sylvester et al, 2005; Karatayev et al, 2007; Darrigran e Damborenea, 2011; Silva et al, 2013).

Além dessas importantes características, *L. fortunei* demonstra uma tolerância notável a variações térmicas (Perepelizin & Boltovskoy, 2015), o que possibilita a sobrevivência e reprodução em condições que poderiam ser desfavoráveis para maioria dos animais aquáticos (Willmer et al., 2004; Bridi, 2010). A faixa de tolerância para sobrevivência da espécie varia entre 5 a 47,3°C (com exposição gradual) (Perepelizin & Boltovskoy, 2011 a;b; Andrade et al., 2018; Andrade et al., 2021; Boltovskoy et al., 2021; Paolucci & Thuesen, 2021; Xia et al., 2021 ; Yang et al., 2023), enquanto que para reprodução a temperatura ideal foi estabelecida entre 26 e 28°C (Cataldo, 2015). Essa tolerância é um atributo bastante relevante, uma vez que a temperatura é um dos fatores abióticos de maior importância na definição da distribuição das espécies (Somero, 2002; Kelley, 2014).

Porém, mesmo que a espécie se mostre tolerante a variações térmicas, é sabido que mudanças na temperatura podem desencadear estresse, o qual pode resultar em alterações nos processos fisiológicos em diferentes escalas (Adamski et al., 2022) influenciando nos processos bioquímicos e celulares. Estas alterações podem ocorrer em dois níveis biológicos: primário afetando diretamente os órgãos-

alvo, como as brânquias, e provocando mudanças na permeabilidade e vascularização dos tecidos e, secundário impactando o balanço hidromineral e o metabolismo do organismo (Mazeaud, 1981; Ungell et al., 1984; Regino et al., 2022; Xu & Wang, 2022; Guo et al, 2023; Murano et al.,2023;). Deste modo, processos essenciais à manutenção da homeostasia e do funcionamento orgânico como, por exemplo, à manutenção da composição da concha, osmorregulação, regulação do pH metabolismo, estresse oxidativo, valores nutricionais e funções imunes, são afetados o que, conseqüentemente, altera o desempenho dos indivíduos (Somero, 2002; Willmer et al., 2004; Kelley, 2014; Cardoso et al., 2019; Farias et al., 2024). Além disso, o aumento da temperatura pode desnaturar proteínas, alterar a estrutura tridimensional ou aumentar a energia cinética das moléculas que eleva as taxas de colisões entre as enzimas e seus substratos (Willmer et al., 2004; Daniel et al., 2007; Werlang et al., 2018) inviabilizando a sobrevivência dos organismos (Willmer et al., 2004; Zheng et al., 2024).

Assim, como até o presente momento não existia na literatura informações dessa natureza sobre a espécie, o objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas de *L. fortunei* diante do aumento da temperatura, na tentativa de elucidar os mecanismos de tolerância e sobrevivência do mexilhão-dourado. Essas informações são fundamentais para compreender aspectos básicos da fisiologia da espécie e os mecanismos envolvidos nas respostas diante do aumento da temperatura, os quais podem ser importantes para a definição dos padrões e dinâmicas de invasão de uma determinada espécie (Kelley, 2014), bem como úteis em estratégias de controle de envolvam variações deste parâmetro.

MATERIAL E MÉTODOS

Classificação dos animais para experimentação

Para a realização dos experimentos os animais foram classificados de acordo com o seu tamanho. Para isso, as larvas (micrômetros) foram consideradas como classe I, pós-larvas (0,3 até 0,7 mm) como classe II, os juvenis I (>0,7 até 1cm) como classe III, juvenis II (>1 até 2 cm) como classe IV e adultos (>2 até 3cm) como classe V.

Amostragem e aclimação dos animais em laboratório

A coleta dos animais ocorreu entre os meses de outubro de 2023 a janeiro de 2024, no reservatório do Rio Paraná localizado no Refúgio Biológico de Boa Vista - Itaipu (25°26'49.30"S 54°32'57.99"O). Durante a coleta, variáveis abióticas como temperatura da água (C°), oxigênio dissolvido (mg/L), pH, sólidos totais (mg/L) e salinidade (%) (Sonda YSI ProQuatro®) foram monitorados. Os espécimes coletados foram depositados em tambores com ~15 L, com água do local de coleta e mantidos sob aeração constante durante o transporte até o Laboratório de Toxicologia e Avaliação Ambiental – LACTEC (Curitiba/PR). No laboratório os animais foram lavados (2x) com a água do local de coleta e acondicionados em aquários estoque de 74 L com filtragem e aeração constantes, sob fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, em sala climatizada a $21.9 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$ e $78.6 \pm 1,72\%$ de umidade relativa (Termohigrômetro Digital Akso - Ak28®). Os parâmetros abióticos dos aquários tais como pH, temperatura e amônia total (Sonda YSI ProQuatro®), condutividade, salinidade, sólidos totais dissolvidos (Medidor Multiparâmetros Akso®), cloro total livre (Cloro Tester Akso®), iluminância (Luxímetro Akso – Ak 305), nitrito (Kit Labcon Test Água Doce: Determinação de Nitrito - ALCON®) e dureza (Kit Labcon Test Água Doce: Dureza em carbonatos KH – ALCON®) foram coletados diariamente. A média dos parâmetros abióticos determinados ao longo da aclimação (15 dias) é apresentada na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Após avaliação dos parâmetros abióticos procedia-se a higienização do filtro dos aquários. Não houve a necessidade de realizar troca de água dos aquários durante o período de aclimação. Durante a aclimação os animais foram alimentados com alimento comercial Sera Marine Veggie Flakes Nature® contendo Spirulina (7%) e algas *Haematococcus*.

Tabela 8. Parâmetros abióticos dos aquários de aclimação

pH	Temp. (°C)	Dur (°dH)	NH ₃ total (ppm)	NO ₂ ⁻ (ppm)	Total Cl- (ppm)	Conduct. (uS/cm)	Ilumin (lux)	Sólidos totais (mg/l)
7.12±0.06	21.2±0,22	3.29±0.08	0.031±0.005	1.40±0.15	0.24±0.07	181.0±10.8	437.6±4.72	90.4±5.42

Dados apresentados como $\pm$ erro padrão da média

Experimentos de exposição a temperatura subletal

Os exemplares utilizados no experimento subletal foram removidos do aquário de aclimação, individualizados, através do corte do bisso e, medidos (paquímetro

digital Absolute Mitutoyo®), de modo que apenas indivíduos juvenis I (0,7mm até 1 cm) e juvenis II (1 até 2cm) (n=150), fossem empregados nos experimentos.

Em seguida, os animais foram distribuídos, individualmente, em béqueres de vidro, de 250ml, contendo 100ml de água deionada e aeração constante de modo a compor dois grupos: controle e experimental. Os animais não foram alimentados durante o experimento, a alimentação foi suspensa 24 horas antes do experimento. A temperatura experimental foi estabelecida em 32°C a partir de experimentos de tolerância térmica (Fernandes et al., em preparação). A exposição dos animais a essa temperatura ocorreu por um período de 96h, sob condições estáticas, através da manutenção dos aquários em banho-maria. A média da temperatura dos aquários experimentais (n=75) foi mantida em $31.5 \pm 0.05^\circ\text{C}$, através de um sistema de controle digital. Os animais expostos a condição controle (n=75) foram mantidos sob temperatura ambiente ($21.9 \pm 0.28^\circ\text{C}$). A mortalidade dos animais em cada uma das condições foi verificada a cada 24h. Os indivíduos com as valvas totalmente abertas ou que não responderam ao estímulo de toque, foram considerados mortos e retirados dos experimentos.

Além da mortalidade, dados de temperatura e concentração de amônia total; Sonda YSI ProQuatro) foram determinados em cada um dos aquários controles e experimentais. Ao final das 96h, os animais sobreviventes em cada uma das condições foram retirados dos aquários para a coleta de hemolinfa e água da cavidade do manto. Essas foram acondicionadas em microtubos e imediatamente armazenadas em freezer -20°C até serem utilizadas nas determinações de osmolalidade, íons (Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+}), glicose e lactato. Após isso, 70 animais de cada uma das condições, controle e experimental, foram removidos das conchas, acondicionados em microtubos e imediatamente congelados em freezer -80°C onde foram mantidos até a realização das análises de determinação de teor de hidratação e, da atividade específica das enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$, H^+/ATPase e anidrase carbônica e proteínas totais. Doze desses indivíduos (animais inteiros) (n=6 controle e n=6 experimentais) foram, logo após a retirada de fluidos, fixados em alfac e, posteriormente submetidos à preparação histológica necessária à observação branquial.

Análise das amostras

Osmolalidade (Osm)

A osmolalidade foi determinada em amostras de hemolinfa, água da cavidade do manto e água dos aquários (controles e experimentais), sem diluição (10ul), através da leitura em micro-osmômetro de pressão a vapor (Wescor®5600 VAPRO). Os resultados foram expressos em mOsm.Kg H₂O⁻¹.

Dosagens de íons

A concentração dos íons cloreto (Cl⁻), magnésio (Mg²⁺) e cálcio (Ca²⁺) foi determinada em amostras de hemolinfa, água da cavidade do manto e água dos aquários (controles e experimentais), utilizando kits colorimétricos comerciais (Labtest®), com leituras de absorbância a 450, 505nm e 570nm, respectivamente, através do espectrofotômetro (Molecular Devices® SpectraMax M2e) e, resultados expressos em mM. Para a determinação dos íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺), as amostras de hemolinfa, água da cavidade do manto e água dos aquários controles e experimentais foram diluídas (1:200) em água ultra-pura (Mili-Q®) e analisadas em fotômetro de chama (DIGIMED-DM-64-4E), com resultados expressos em mM.

Dosagens de glicose e lactato

As concentrações de glicose e lactato foram determinadas em amostras de hemolinfa e água da cavidade do manto, sem diluição, utilizando kits colorimétricos comerciais (Labtest®), com leituras de absorbância a 505 nm e 550 nm, respectivamente, em espectrofotômetro (Molecular Devices® SpectraMax M2e) e, com resultados expressos em mg/dL.

Teor hídrico

O teor de hidratação tecidual foi determinado no animal inteiro (n= 10 para cada uma das condições, controle e experimental). Para a realização dessa análise, os animais foram pesados em tubos tipo eppendorf, em balança analítica (Bel Engineering® M214Ai, precisão 0,1 mg). Em seguida, eram colocados na estufa (QUIMIS® Q13) a 60°C graus até a obtenção do peso constante. Ao final o material era pesado novamente e, a perda de água demonstrada por porcentagem em relação ao peso inicial da amostra.

Quantificação proteínas totais

A quantificação da concentração total de proteínas nos homogeneizados teciduais foi realizada para os ensaios das enzimas anidrase carbônica, $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e H^+ATPase seguindo o protocolo descrito por Bradford (1976). As análises foram realizadas em triplicata em microplacas de 96 poços, utilizando o reagente Bradford Reagent (Sigma Aldrich®). A leitura ocorreu a 595nm no espectrofotômetro (Molecular Devices® SpectraMax M2e).

Atividade das enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e H^+ATPase

Para a determinação da atividade específica das enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e H^+ATPase , foi utilizado o protocolo descrito por Kültz e Somero (1995). O animal inteiro foi descongelado, pesado e homogeneizado a 10% (peso/volume em g/mL) em tampão SEI+SEID com pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado (2000xg por 5 minutos a 4°C), e o sobrenadante foi separado para as análises de proteína total e para a atividade das enzimas.

Atividade específica da Anidrase Carbônica (AC)

Para o experimento da atividade da enzima AC, amostras de tecidos (animal inteiro) foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas a 10% (peso/volume em g/mL) utilizando um tampão fosfato 10 mM, pH 7,4. O homogeneizado foi então centrifugado (12000xg por 5 minutos a 4°C), e o sobrenadante foi alíquotado para as análises de proteína total e da atividade específica da enzima. A atividade da anidrase carbônica foi determinada pelo método descrito por Vitale et al. (1999), baseado em Henry (1991). A atividade específica da anidrase carbônica (AAC) foi calculada pela fórmula: $\text{AAC} = [(\text{TC}/\text{TNC}) - 1]/\text{mg de proteína total na amostra}$ (Burnett et al. 1981; Vitale et al. 1999).

Análise histopatológica

Para caracterização histológica das brânquias, ao final das 96 horas de experimentação, seis indivíduos do grupo controle e seis indivíduos do grupo experimental foram cuidadosamente removidos por inteiro das conchas e fixados em alfac por 16 horas. Após o período de fixação, os tecidos foram lavados duas vezes com álcool 70% e em seguida, foram desidratados em bateria alcoólica, diafanizados, incluídos em Paraplast regular (Sigma P3558®) e emblocados. Os blocos com os

tecidos foram trimados e, em seguida, seccionados (5 μm), corados com ácido periódico de Schiff e contra-corados com hematoxilina (PAS-H). As lâminas foram observadas em microscópio de luz (Leica DMLS2) com captura de imagem (LeicaXXC300FX e Leica application V3.1.0.).

Análises Estatísticas

Os resultados são apresentados como média acompanhada do erro padrão da média (SEM). Os resultados obtidos para os parâmetros de osmolalidade, íons, glicose e lactato foram submetidos ao teste T de Student e quando não atendiam aos critérios de normalidade, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. As médias de osmolalidade, íons, glicose e lactato foram comparadas na seguinte relação: controle = hemolinfa X manto; experimental = hemolinfa X manto; hemolinfa = controle X experimental; manto = controle X experimental. Tanto as análises estatísticas quanto os gráficos foram elaborados no software SigmaPlot 15.0.

RESULTADOS

A exposição de *L. fortunei* a temperatura de 32°C por 96h não resultou em alterações significativas na osmolalidade da hemolinfa e na água da cavidade do manto do grupo experimental em relação ao controle ($p=0,937$; $p=0,831$, respectivamente) (Figura 6). Houve diferenças significativas entre a hemolinfa e água da cavidade do manto na condição experimental ($p=0,001$) e hemolinfa e água da cavidade do manto na condição controle ($p<0,001$).

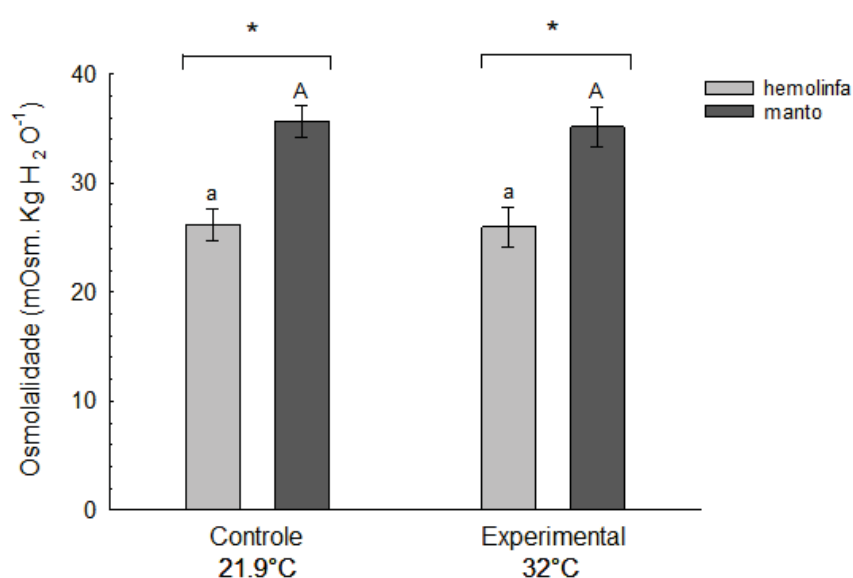


Figura 6. Osmolalidade (Osm) em hemolinfa e água da cavidade do manto dos grupos controle (n=60) e experimental (n=42). Letras denotam a diferença entre o grupo controle e experimental tanto para hemolinfa quanto para água da cavidade do manto e, barras acompanhadas de asteriscos apontam a diferença entre hemolinfa e água da cavidade do manto dentro de uma mesma condição (controle ou experimental).

Houve diferenças significativas na concentração de Cl⁻ na hemolinfa no grupo experimental em relação ao controle ($p=0,028$). Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de Na⁺ ($p=0,609$) na hemolinfa e nem nas concentrações de Na⁺ ($p=0,764$) e Cl⁻ ($p=0,568$) na água da cavidade do manto entre o grupo experimental e o grupo controle. Houve alterações significativas entre a hemolinfa e água da cavidade do manto tanto no grupo experimental ($p=0,001$), quanto no grupo controle ($p<0,001$) (

Figura 7).

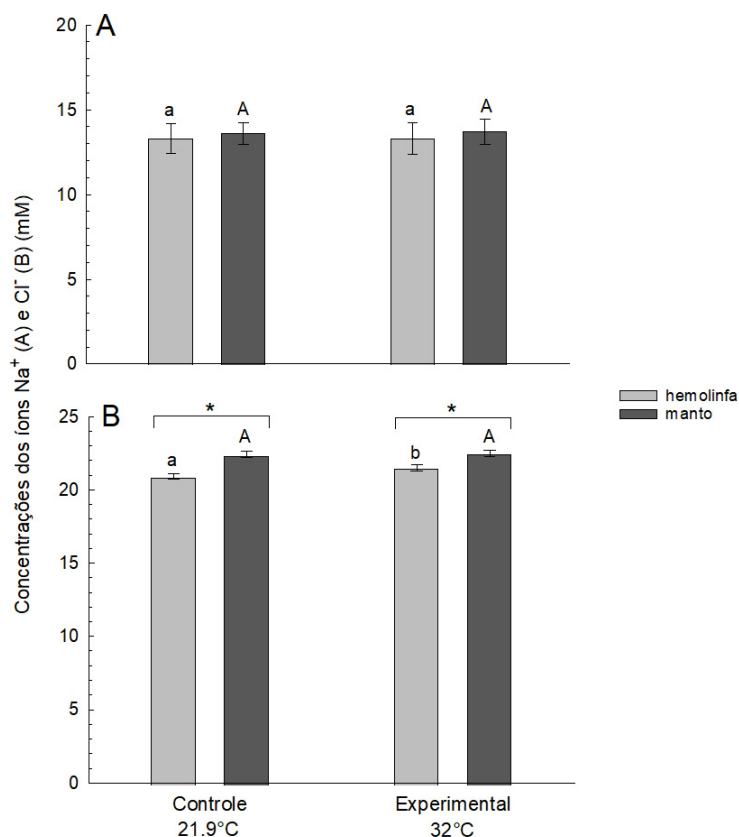


Figura 7. (A) Concentração de íons Na^+ em hemolinfa e manto dos grupos controle (n=61) e experimental (n=39). (B) Concentração de íons Cl^- em hemolinfa e manto dos grupos controle (n=62) e experimental (n=45). Letras denotam a diferença entre o grupo controle e experimental tanto para hemolinfa quanto para água da cavidade do manto e, barras acompanhadas de asteriscos apontam a diferença entre hemolinfa e água da cavidade do manto dentro de uma mesma condição (controle ou experimental).

Não houve alterações significativas nas dosagens de Ca^{2+} ($p=0,249$), Mg^{2+} ($p=0,649$) e K^+ ($p=0,616$) na hemolinfa e água da cavidade do manto ($p=0,148$; $p=0,398$; $p=0,064$, respectivamente) do grupo experimental em relação ao controle. Houve diferença significativa nas concentrações dos íons Ca^{2+} ($p=0,006$) e K^+ ($p<0,001$) entre a hemolinfa e água da cavidade do manto no grupo experimental e, diferenças significativas nas concentrações dos íons Ca^{2+} ($p<0,001$), Mg^{2+} ($p<0,001$) e K^+ ($p=0,040$) entre a hemolinfa e água da cavidade do manto na condição controle. (

Figura 8)

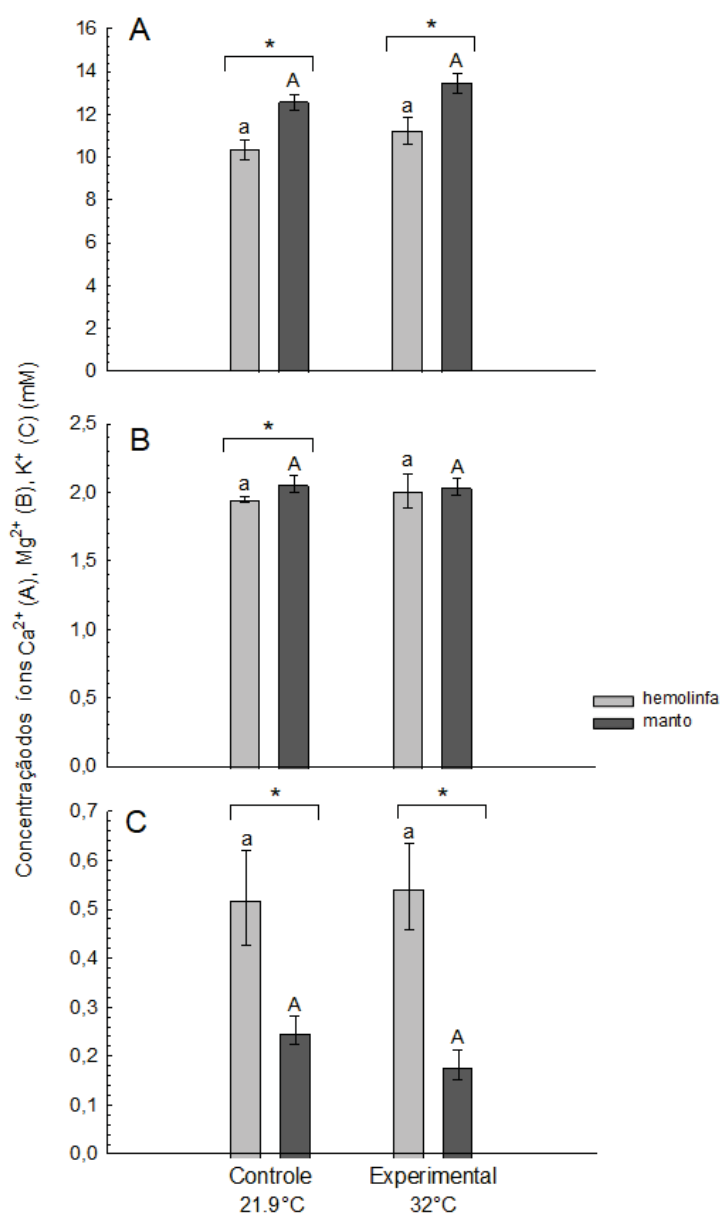


Figura 8. (A) Concentração de íons Ca^{2+} , (B) Mg^{2+} e (C) K^{+} em amostras de hemolinfa (barra cinza claro) e água da cavidade do manto (barra cinza escuro) dos grupos controle (n=61) e experimental (n=44). Letras denotam a diferença entre o grupo controle e experimental tanto para hemolinfa quanto para água da cavidade do manto e, barras acompanhadas de asteriscos apontam a diferença entre hemolinfa e água da cavidade do manto dentro de uma mesma condição (controle ou experimental).

Não houve diferenças significativas na concentração de glicose da hemolinfa ($p=0,499$) e na água da cavidade do manto ($p=0,265$) no grupo experimental em relação ao grupo controle (

Figura 9A). No entanto, houve aumento na concentração de lactato no grupo experimental em relação ao grupo controle tanto na hemolinfa ($p=0,023$) quando na água da cavidade do manto ($p=0,014$) (

Figura 9B).

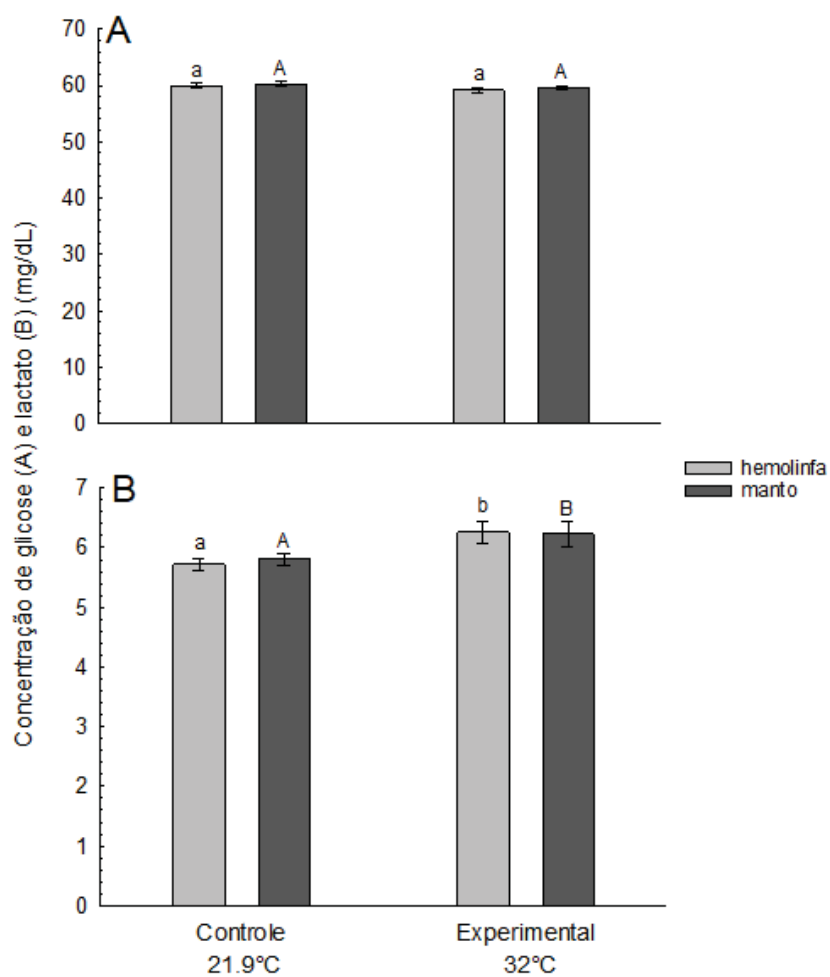


Figura 9. (A) Concentração de glicose e (B) Concentração de lactato em hemolinfa e água da cavidade do manto dos grupos controle (n=61 - 62) e experimental (n=45). Letras denotam a diferença entre o grupo controle e experimental da hemolinfa e manto.

Figura 10).

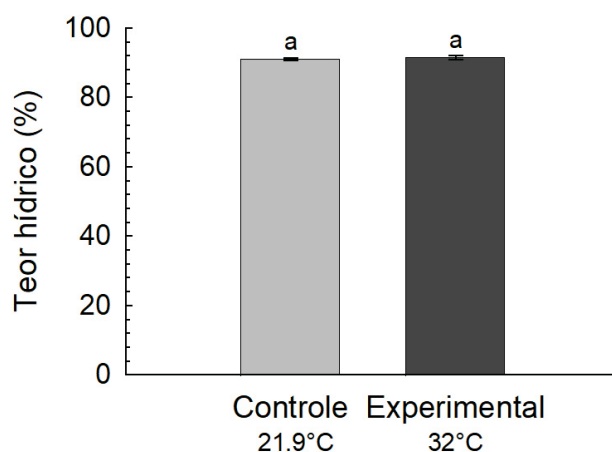


Figura 10. Teor de hidratação determinado em exemplares de *L. fortunei* submetidos aos grupos controle e experimental (32°C). Letras denotam a diferença entre o grupo controle e experimental.

Não houve diferença significativa na atividade ATPásica total ($p = 0,880$) e nem nas atividades específicas das enzimas $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ ($p = 0,255$), H^+ATPase ($p = 0,368$) e anidrase carbônica ($p=0,328$) no grupo experimental em relação ao controle (Figura 11).

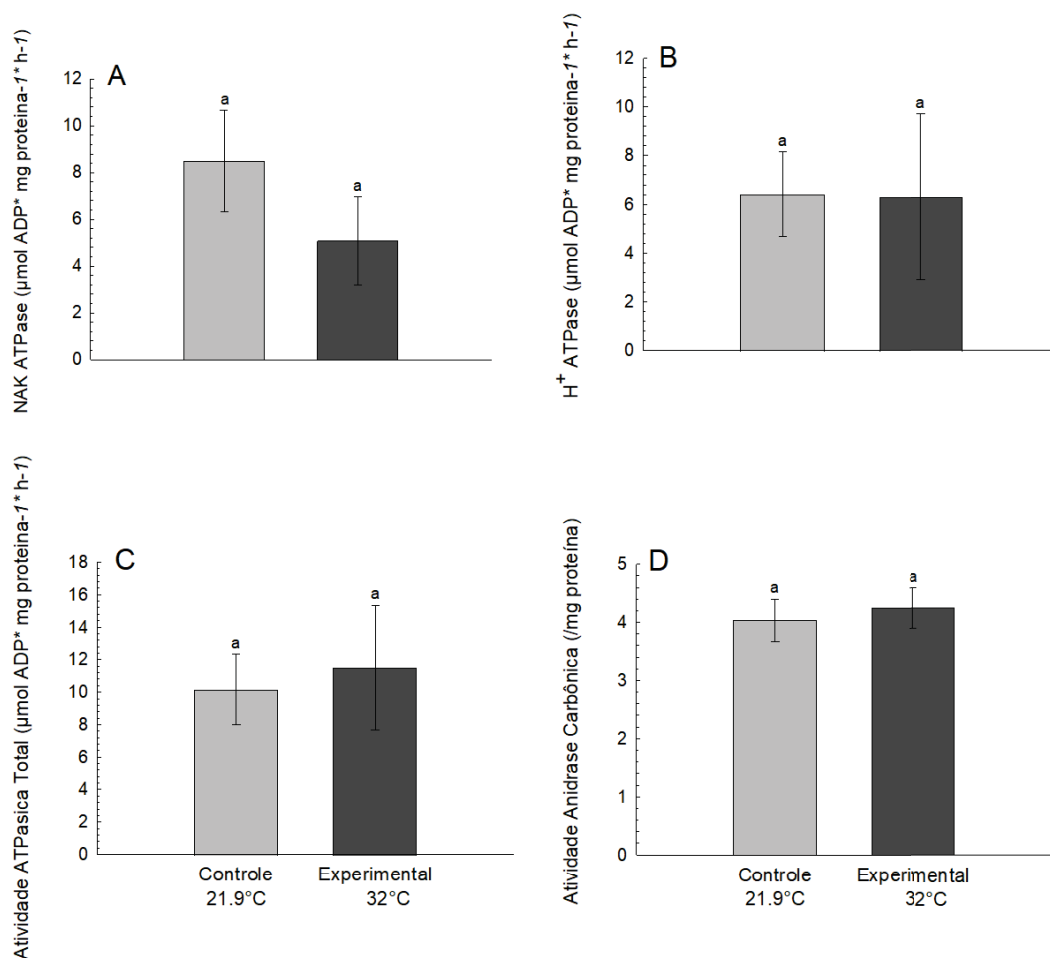


Figura 11. Atividade específica das enzimas Na^+K^+ -ATPase (A), H^+ ATPase (B), atividade ATPasica total (C) e anidrase carbônica (D). Letras iguais denotam a ausência de diferença entre o grupo controle e experimental.

Os exemplares de *L. fortunei* submetidos à condição experimental apresentaram alterações histopatológicas nas brânquias tais como: dilatação do seio hemolinfático dos filamentos branquiais, perda de cílios, alterações degenerativas na junção interfilamentosa, vacuolização epitelial nos filamentos branquiais e elevação epitelial da zona abfrontal quando comparado aos animais do grupo controle cuja estrutura dos filamentos branquiais apresentava-se majoritariamente normal e nitidamente separados em três zonas: frontal, intermediária e abfrontal (Figura 12).

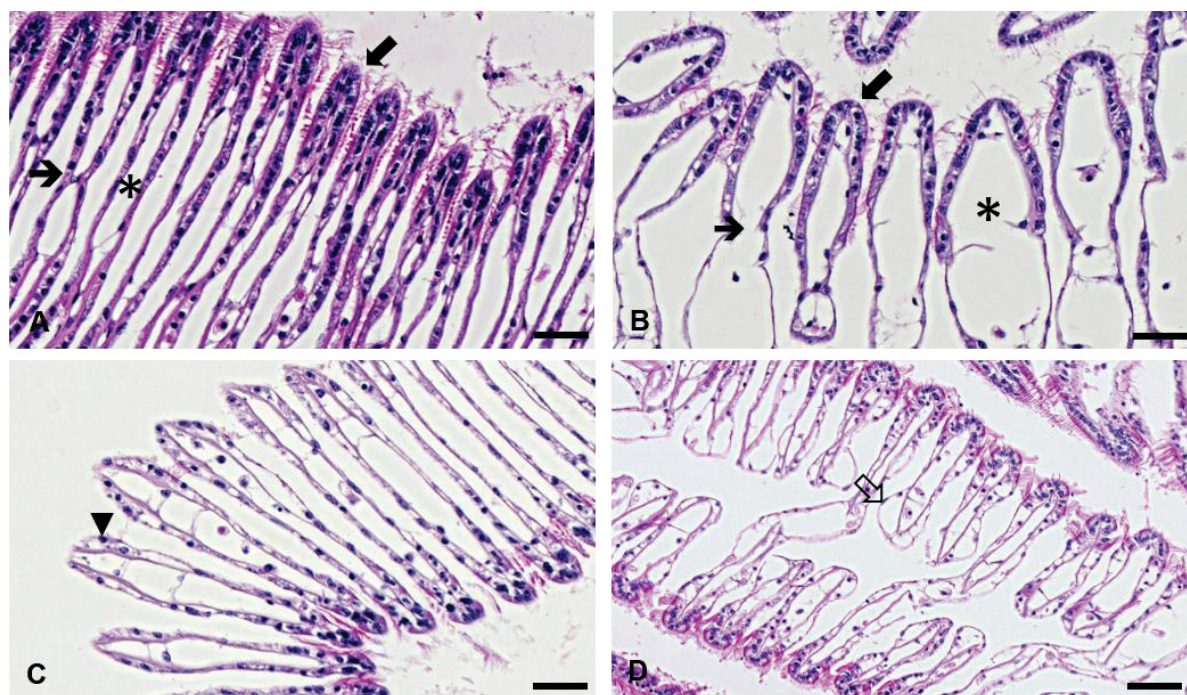


Figura 12. Alterações histopatológicas na microestrutura das brânquias de *L. fortunei* coradas com hematoxilina e eosina. A: Grupo controle. Filamentos branquiais normais com cílios nas células frontais (➤), seio hemolinfático normal dos filamentos branquiais (*) e junção interfilamentosa (➤). B, C e D: Grupo exposto. A: perda de cílios (➤), dilatação do seio hemolinfático (*), alterações degenerativas na junção interfilamentosa (➤), vacuolização epitelial (▴) e elevação epitelial (◁). Barra de escala: 50µm.

DISCUSSÃO

Considerando que a temperatura é um fator chave na sobrevivência das espécies (Somero, 2002; Willmer et al., 2004; Adamski et al., 2022), o aumento desta representa um fator de estresse para diferentes organismos (Sanders, 2008). Nesse contexto, a compreensão das respostas fisiológicas dos seres vivos em condições de estresse é fundamental, pois estas respostas atuam como importantes indicadores de alterações fisiológicas (Boff & Oliveira, 2021), inclusive comprometendo a sobrevivência dos bivalves (Masanja et al., 2023; Raymond et al., 2024; Gordillo et al., 2025).

Nesse sentido, embora a temperatura possa causar alterações osmorregulatórias (Stanley & Colby., 1971; Fiess et al., 2007; Chacoff et al., 2018; Walker et al., 2020; Malintha et al., 2023), os presentes resultados corroboram com a tolerância de *L. fortunei* ao aumento nesse parâmetro (e.g., Perepelizin & Boltovskoy,

2011b; Karatayev et al., 2015), pois, apesar de a temperatura letal média para a espécie ter sido estabelecida em 34°C (Fernandes et al. em preparação), a temperatura subletal de 32°C não foi extrema o suficiente para causar alterações osmo-iônicas.

Dados sobre aspectos osmorregulatórios do mexilhão-dourado são bastante escassos na literatura. Há, até o presente momento, um único estudo reportando dados dessa natureza. De acordo com Deaton et al. (1989) a osmolidade da hemolinfa determinada para *L. fortunei* apresentou valores de 40 (mOsm. Kg H₂O⁻¹), um valor superior aos nossos resultados em condição controle (i.e., basais) de $26,14 \pm 1,46$ (mOsm. Kg H₂O⁻¹) em água doce ($0,89 \pm 0,20$ mOsm. Kg H₂O⁻¹). Do mesmo modo, valores de osmolalidade descritos na literatura para outras espécies de bivalves de água doce também foram superiores ao encontrado para *L. fortunei*. Os valores descritos variaram de $31,8 \pm 1,1$ (mOsm. Kg H₂O⁻¹) para *Pinctada margaritifera* (Shakhmatova et al., 2006), 42,6 (mOsm. Kg H₂O⁻¹) para *Dreissena polymorpha* (Byrne and Dietz, 2006), $45 \pm 4,9$ (mOsm. Kg H₂O⁻¹) para *Sinanodonta woodiana* (Matsushima & Kado, 1982) e $63,2 \pm 0,73$ (mOsm. Kg H₂O⁻¹) para *Corbicula fluminea* (Ruiz and Souza, 2008). Desse modo, os valores encontrados para outros bivalves são maiores do que os valores encontrados em nosso estudo, o que pode ressaltar, as diferenças dos meios em que estes animais podem ter sido submetidos ou a característica particular de cada espécie, baseada em seu arcabouço fisiológico/osmorregulatório.

A osmolalidade é a concentração total de solutos por quilograma de solvente e, em bivalves como *Limnoperna fortunei*, é principalmente determinada pelos íons sódio (Na⁺) e cloreto (Cl⁻) na hemolinfa. e A manutenção da concentração de íons é fundamental para o equilíbrio do pH dos fluidos como a hemolinfa e a água da cavidade do manto (Byrne & Dietz, 1997; Hu et al., 2017; Tresguerres et al., 2023), além de preservar o volume celular (Eveloff & Warnock, 1987; Land et al., 1998; Strange, 2004). Neste estudo, observou-se que a osmolalidade da água da cavidade do manto foi maior do que a da hemolinfa tanto na condição experimental quanto no controle. Esta diferença entre estes dois compartimentos sugere tratar-se de uma característica basal de *L. fortunei*. A cavidade do manto atua como um ambiente intermediário entre o meio interno e externo do organismo (McLachlan & Erasmus, 1974; Medeiros et al., 2020). A excreção contínua de solutos (amônia) e metabólitos pela cavidade do manto pode contribuir para elevação da sua osmolalidade em

relação à hemolinfa (Allam & Paillard, 1998). Os processos osmorregulatórios da cavidade do manto são importantes para manter a homeostase interna dos moluscos, sendo um epitélio de trocas. A água proveniente do ambiente que circula na cavidade do manto do mexilhão pode conter partículas em suspensão, nutrientes, oxigênio dissolvido e resíduos que influenciam na osmolalidade da água da cavidade do manto. Essa capacidade de regulação entre os meios permite que estes realizem trocas de substâncias com o ambiente externo (McLachlan & Erasmus, 1974). Compreender como os ajustes osmorregulatórios ocorrem dentro da cavidade do manto é importante para o entendimento a respeito de como os moluscos mantêm a homeostase interna e realizam trocas com o ambiente externo (Gony & Boudou., 1997). Corroborando a manutenção da homeostasia osmo-iônica dos indivíduos, não foram observadas alterações na atividade ATPásica total nem nas enzimas específicas (AC, NAK e $H^+ATPase$). A ausência de diferença pode indicar um mecanismo regulatório estável e que a manutenção da homeostase osmo-iônica está ocorrendo nos indivíduos experimentais. Estudos futuros são necessários para uma melhor compreensão a respeito da caracterização destes mecanismos e das respostas osmorregulatórias do mexilhão-dourado frente a diferentes estresses ambientais.

A capacidade de ajuste dos índices metabólicos dentro dos limites de tolerância térmica possibilita a obtenção de energia para sobrevivência, sendo um ponto chave para expansão em diferentes habitats (Oliveira et al., 2015; Paolucci, 2022). Sabendo disso, mensurar os índices metabólicos pode ser uma ferramenta importante para conhecer os aspectos de tolerância a diferentes tipos de estressores (Lighton, 2008). O metabolismo dos bivalves normalmente é aeróbico, gerando um suprimento de energia constante para sustentar os processos fisiológicos (Gordillo et al., 2025). Diante disso, a ausência de alterações significativas na concentração de glicose no grupo experimental em comparação com o grupo controle pode ser atribuída à tolerância da espécie ao aumento da temperatura ou a uma compensação metabólica. Neste caso, o organismo pode ter ajustado as taxas de consumo e reposição de glicose, resultando na manutenção de níveis estáveis. Isso sugere que aparentemente, *L.fortunei* apresenta mecanismos fisiológicos eficientes para lidar com o aumento da temperatura, sem comprometer o seu equilíbrio osmorregulatório e energético (Paolucci & Thuesen., 2022).

No entanto, foi observado um aumento nas concentrações de lactato na condição experimental em comparação com a condição controle tanto na hemolinfa

quanto na água da cavidade do manto. Em situações de estresse, a concha atua como o primeiro mecanismo de proteção em bivalves (Tran et al., 2003; Anestis et al., 2007), levando à necessidade de utilizar fontes anaeróbias para a respiração (Weihe & Abele, 2008; Li et al., 2019; Yin et al., 2017; Grimmelpont et al., 2024). Como resultado, indivíduos estressados acabam acumulando lactato em comparação a indivíduos não estressados (Weihe & Abele, 2008; Li et al., 2019; Yin et al., 2017; Grimmelpont et al., 2024). Porém, durante os experimentos, os animais permaneceram com a concha parcialmente aberta. No entanto, é importante ressaltar que há aumento do metabolismo associado à elevação da temperatura, o que ocasiona uma intensificação na produção do ATP e, conseqüentemente, no consumo de oxigênio, tornando ainda mais necessária a respiração anaeróbia (Gordillo et al., 2025). Assim, embora os animais estivessem com a concha parcialmente aberta, esta maior demanda energética pode ter ocasionado estresse metabólico, levando o organismo a utilizar as vias anaeróbias e ampliando a geração de subprodutos como o ácido láctico (Rabinowitz & Enerbäck., 2021). Sendo assim, pode-se concluir que em condições de estresse, como o aumento da temperatura, os organismos podem passar por um estresse metabólico. Com estes resultados, seria esperado que os animais desenvolvessem uma acidose, por conta de um possível aumento da PCO_2 e do ácido láctico. Neste cenário, poderia ocorrer uma maior atividade do trocador Cl^-/HCO_3^- , bem como da enzima anidrase carbônica (Wood & Munger., 1994; Souza-Bastos & Freire., 2009; Tresguerres & Hamilton., 2017; Jeffrey et al., 2018).

Apesar da ausência de danos osmorregulatórios significativos, a exposição de *L. fortunei* por 96h a 32 graus foi suficiente para causar danos à microestrutura das brânquias, os quais apresentaram alterações degenerativas e perda ciliar. Neste estudo, foram observadas diferentes alterações na microestrutura dos filamentos branquiais de *L. fortunei*. Foi identificada a dilatação do seio hemolinfático, indicando a formação de edema na estrutura onde circula a hemolinfa, o que sugere a ocorrência de uma lesão severa (Khan et al., 2015). Além disso, constatou-se a perda ciliar, corroborando que temperaturas elevadas podem alterar a frequência dos batimentos ciliares e comprometer a eficiência do processo de filtração, o que pode explicar o aumento do lactato (Jorgensen et al., 1990; Specht & Fuchs, 2018; Masanja et al., 2023). Outras alterações encontradas incluem degeneração na junção interfilamentosa, indicando um processo de degeneração tecidual e apoptose e vacuolização epitelial, caracterizada pela formação de vacúolos nas células epiteliais

dos filamentos branquiais. Além disso, foi observada a elevação epitelial na zona abfrontal indicando um deslocamento da camada de células epiteliais. As brânquias estão diretamente expostas ao meio e, portanto, são suscetíveis a fatores químicos e físicos, como, por exemplo, mudanças térmicas (Hwang et al., 2011; Garofalo et al., 2019). Esses resultados são compatíveis aos descritos para o estresse térmico que, se prolongado, pode levar a deformação e edema grave de lamelas branquiais, proliferação e hipertrofia de mucócitos, fusão e hipertrofia de células epiteliais e necrose (Hooper et al., 2014; Garofalo et al., 2019; Yan et al., 2022).

A lesão celular por calor é caracterizada pela perturbação da permeabilidade da membrana e posterior interrupção do equilíbrio iônico (Bowler et al, 1983). E isso leva ao segundo motivo possível para o aumento na concentração de lactato, que pode ser atribuído ao dano nas brânquias, o qual comprometeria a captação de O_2 e, consequentemente levaria o animal a recorrer ao metabolismo anaeróbico. Nesse sentido, como o aumento da temperatura foi capaz de alterar a estrutura branquial do mexilhão-dourado, as alterações fisiológicas observadas (i.e., aumento do lactato, Cl^- e alterações nas brânquias) podem refletir alteração na capacidade de filtração e realização de trocas com o meio externo.

Portanto, os resultados sugerem que o mexilhão-dourado pode exibir tolerância à temperatura e isso é evidenciado pela ausência de alterações osmo-iônicas. Apesar disso, foram observadas mudanças metabólicas, o que sugerem que existe um custo energético para manter a homeostasia em 32°C. Nesse sentido, a fisiologia do organismo pode priorizar a regulação da osmolalidade e íons ao invés de outros processos metabólicos. Assim, apesar de ser uma temperatura subletal, os mexilhões podem ter se aclimatado à temperatura experimental, significando que ainda estão dentro de uma faixa funcional. Apesar disso, as alterações observadas no metabolismo e nas brânquias podem indicar que o estresse térmico representa um desafio fisiológico para a espécie. Sendo assim, estudos adicionais são necessários para investigar os efeitos da temperatura na fisiologia do mexilhão-dourado, especialmente em exposições por um maior período ou diante de temperaturas mais elevadas. Isso tudo pode fazer com que exista a compreensão a respeito da sua capacidade de ajuste e os limites de sua tolerância térmica, sendo relevante para entender o processo de dispersão da espécie, revelando a sua aptidão para colonizar novos habitats.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do aumento da temperatura favorecer a dispersão e desenvolvimento larval de *L. fortunei*, temperaturas a partir de 34°C ou extremas como de 40°C são incompatíveis com a vida de *L. fortunei* consistindo em um fator limitante para sua dispersão. Assim, com base no presente estudo, é possível concluir que a temperatura pode ser uma ferramenta importante para o controle da espécie em ambientes controlados, como instalações industriais. Além disso, o conhecimento a respeito dos aspectos metabólicos e osmo-iônicos da espécie, pode trazer informações importantes sobre aspectos de tolerância para mitigar os impactos de sua dispersão, a partir da identificação das faixas ideais de temperatura, salinidade, pH e da observação de como o organismo responde a diferentes estressores. Neste trabalho constatou-se que embora o mexilhão-dourado apresente tolerância ao aumento da temperatura, o estresse térmico representa um desafio fisiológico, afetando o seu metabolismo e as brânquias, o que indica um comprometimento da homeostasia. Por este estudo ser pioneiro quanto a essas informações, sugere-se que novos estudos sejam realizados para a compreensão de aspectos de tolerância com exposições mais prolongadas e temperaturas elevadas.

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DESENVOLVIDA NO ÂMBITO DO PROGRAMA DE PESQUISA, DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO DO SETOR DE ENERGIA ELÉTRICA REGULADO PELA ANEEL, DENTRO DO PROJETO DE PDI PD-08178-0001/2022, INTITULADO 'AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA E TOLERÂNCIA DE *LIMNOPERNA FORTUNEI* (DUNKER, 1857) AO AUMENTO DA TEMPERATURA', FINANCIADO PELA EMPRESA CHINA THREE GORGES CORPORATION (CTG).

Referências

Andrade, G. R., De Araújo, J. L. F., Nakamura, F. A., Guanãbens, A. C. P., de Carvalho, M. D., & Cardoso, A. V. (2015). Functional Surface of the golden mussel's foot: morphology, structures and the role of cilia on underwater adhesion. *Materials Science and Engineering* 54: 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.032>.

Andrade, J. T. M., Cordeiro, I. S. N., Montresor, C. L., Luz, M. R. D., Luz, C. R. R., Martinez, B. C., Pinheiro, J., Paglia, P. A., & Vidigal, H. D. A. T. (2018). Effect of temperature on behavior, glycogen content, and mortality in *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of Limnology*, 77, 189-198. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1658>.

Anestis, A., Lazou, A., Pörtner, H. O., & Michaelidis, B. (2007). Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(2), R911-R921.

Allam, B., & Paillard, C. (1998). Defense factors in clam extrapallial fluids. *Diseases of aquatic organisms*, 33(2), 123-128.

Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2021). Temperature increases and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1496-1508. <https://doi.org/10.1111/jfb.14599>.

Ayroza, D. M. M. R., Melo, T. J., Pereira, L. P. F., Petesse, M. L., Rebelo, M. F., Carmo, C. F., & Cataldo, D. H. (2021). *Limnoperna fortunei* colonization and macrofouling on net cages in a subtropical reservoir (Brazil). *Aquaculture Research*, 52, 5472-5482. <https://doi.org/10.1111/are.15417>.

Blewett, T. A., Binning, S. A., Weinrauch, A. M., Ivy, C. M., Rossi, G. S., Borowiec, B. G., ... & Norin, T. (2022). Physiological and behavioural strategies of aquatic animals living in fluctuating environments. *Journal of Experimental Biology*, 225(9), jeb242503.

Brasil das águas. Regiões hidrográficas. Retrieved from <https://brasildasaguas.com.br/educacional/regioes-hidrograficas/>.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Boff, S. R., & Oliveira, A. G. (2021). Aspectos fisiológicos do estresse: uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, 10(17), e82101723561-e82101723561.

Boher, F., Jaksic, F. M., Martel, S. I., Orellana, M. J., & Bozinovic, F. (2018). Does thermal physiology explain the ecological and evolutionary success of invasive species? Lessons from ladybird beetles. *Evolutionary Ecology Research*, 19(3), 243-255.

Boltovskoy, D., & Correa, N. (2015). Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America. *Hydrobiologia*, 746, 81-95. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1882-9>.

Boltovskoy, D., Paolucci, E., Macisaac, H. J., Zhan, A., Xia, Z., & Correa, N. (2022). What we know and don't know about the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei*. *Hydrobiologia*, 1-48. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04988-5>.

Boltovskoy, D. (Ed.). (2015). *Limnoperna fortunei*: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel.

Bonacina, L., Fasano, F., Mezzanotte, V., & Fornaroli, R. (2023). Effects of water temperature on freshwater macroinvertebrates: A systematic review. *Biological Reviews*, 98(1), 191-221. <https://doi.org/10.1111/brv.12903>.

Bondarev, I. P. (2013). Ecomorphological analyses of marine mollusks' shell thickness of *Rapana venosa* (VALENCIENNES, 1846) (Gastropoda: Muricidae). *International Journal of Marine Science* 45, 368-388. [10.5376/ijms.2013.03.0045](https://doi.org/10.5376/ijms.2013.03.0045).

Borthagaray, A. I., & Carranza, A. (2007). Mussels as ecosystem engineers: Their contribution to species richness in a rocky littoral community. *Acta Oecologica*, 31, 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2006.10.008>.

Burnett, L. E., Woodson, P. B., Rietow, M. G., & Vilicich, V. C. (1981). Crab gill intra-epithelial carbonic anhydrase plays a major role in haemolymph CO₂ and chloride ion regulation. *Journal of Experimental Biology*, 92(1), 243-254.

Byrne, R. A., & Dietz, T. H. (1997). Ion transport and acid–base balance in freshwater bivalves. *Journal of experimental biology*, 200(3), 457-465.

Byrne, R. A., & Dietz, T. H. (2006). Ionic and acid-base consequences of exposure to increased salinity in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *The Biological Bulletin*, 211(1), 66-75.

Campana, S. E., Stefánsdóttir, R. B., Jakobsdóttir, K. et al. (2020). Shifting fish distributions in warming sub-Arctic oceans. *Science Reports*, 10, 16448. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73444-y>.

Cataldo, D. (2015). Larval Development of *Limnoperna fortunei*. In D. Boltovskoy (Ed.), *Limnoperna fortunei: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel*. Springer, p. 43-53. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_2.

Chung, D. J., & Schulte, P. M. (2020). Mitochondria and the thermal limits of ectotherms. *Journal of Experimental Biology*, 223(20), jeb227801.

Crystal-Ornelas, R., & Lockwood, J. L. (2020). The ‘known unknowns’ of invasive species impact measurement. *Biological Invasions*, 22(4), 1513-1525.

Cuthbert, R. N., Diagne, C., Haubrock, P. J., Turbelin, A. J., & Courchamp, F. (2022). Are the “100 of the world’s worst” invasive species also the costliest?. *Biological Invasions*, 24(7), 1895-1904.

Dallas, H. F., & Ross-Gillespie, V. (2015). Sublethal effects of temperature on freshwater organisms, with special reference to aquatic insects. *Water Sa*, 41(5), 712-726.

Daniel, R. M., Danson, M. J., Eisenthal, R., Lee, C. K., & Peterson, M. E. (2008). The effect of temperature on enzyme activity: new insights and their implications. *Extremophiles*, 12, 51-59.

Darrigran, G., & Damborenea, C. (2011). Ecosystem engineering impact of *Limnoperna fortunei* in South America. *Zoological Science*, 28, 1-7. <https://doi.org/10.2108/zsj.28.1>.

Darrigran, G., & Damborenea, M. C. (2009). Introdução à biologia das invasões. O mexilhão-dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controle. São Carlos: Cubo Editora, p.89-110.

Darrigran, G., & Ezcurra de Drago. (2000). Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. *The Nautilus*, 114(2), 69-73.

De Andrade, J. T. M., Cordeiro, N. I. S., Montresor, L. C., da Luz, D. M. R., Viana, E. M. D. F., Martinez, C. B., & Vidigal, T. H. D. A. (2021). Tolerance of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857)(Bivalvia: Mytilidae) to aerial exposure at different temperatures. *Hydrobiologia*, 848, 2993-3001. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04191-4>.

Deaton, L. E., Derby, J. G., Subhedar, N., & Greenberg, M. J. (1989). Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeta*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 133(1-2), 67-79.

Dowd, W. W., & Somero, G. N. (2013). Behavior and survival of *Mytilus* congeners following episodes of elevated body temperature in air and seawater. *Journal of Experimental Biology*, 216(3), 502-514. <https://doi.org/10.1242/jeb.076620>.

Duchini, D., Boltovskoy, D., & Sylvester, F. (2015). Detachment, displacement and reattachment activity in a freshwater byssate mussel (*Limnoperna fortunei*): the effects of light, temperature and substratum orientation. *Biofouling*, 31, 599-611. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2015.1080251>.

Ernandes-Silva, J., Pinha, G. D., & Mormul, R. P. (2017). Environmental variables driving the larval distribution of *Limnoperna fortunei* in the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 29, e108. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X7716>.

Ernandes-Silva, J., Ragonha, F. H., Jati, S., & Takeda, A. M. (2016). *Limnoperna fortunei* Dunker, 1857 larvae in different environments of a Neotropical floodplain: relationships of abiotic variables and phytoplankton with different stages of development. *Brazilian Journal of Biology*, 76, 154-161. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.15514>.

Eveloff, J. L., & Warnock, D. G. (1987). Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 252(1), F1-F10.

Fabián, J. D., Ferrer, C., Pereira, J., Muniz, P., Capurro, L., Mandiá, M., Failache, G., & Brugnoli, E. (2021). Variación anual de larvas del mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) en sistemas de refrigeración de centrales hidroeléctricas en embalses del Río Negro, Uruguay. *Innotec*, 22, e572-e572. <https://doi.org/10.26461/22.03>.

Farias, L., Beszteri, B., Castellanos, A. M. B., Doliwa, A., Enss, J., Feld, C. K., ... & Le, T. Y. (2024). Influence of salinity on the thermal tolerance of aquatic organisms. *Science of the Total Environment*, 176120.

Fernández, I., Mozanzadeh, M. T., Hao, Y., & Gisbert, E. (2022). Physiological impacts of global warming in aquatic organisms. *Frontiers in Physiology*, 13, 914912. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.914912>.

Fields, P. A. (2011). Proteins and temperature. In: Farrell, A.P. (ed). *Encyclopedia of fish physiology: Energetics, interactions with the environment, lifestyles, and applications*. Academic, New York 1703-1708. 1370846644397537552.

Fiess, J. C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L. G., Yancey, P. H., Hirano, T., & Grau, E. G. (2007). Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(2), 252-264.

Finney, D. J. (1978). *Statistical method in biological assay* (No. Ed. 3, p. 508pp).

Franks, S. J., & Hoffmann, A. A. (2012). Genetics of climate change adaptation. *Annual Review of Genetics*, 46(1), 185-208. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155511>.

Ganser, A. M., Newton, T. J., & Haro, R. J. (2013). The effects of elevated water temperature on native juvenile mussels: implications for climate change. *Freshwater Science*, 32(4), 1168-1177.

Gates, K. K., Vaughn, C. C., & Julian, J. P. (2015). Developing environmental flow recommendations for freshwater mussels using the biological traits of species guilds. *Freshwater Biology*, 60(4), 620-635.

Gentili, R., Schaffner, U., Martinoli, A., & Citterio, S. (2021). Invasive alien species and biodiversity: Impacts and management. *Biodiversity*, 22(1-2), 1-3.

Ghosh, S., Matthews, B., & Petchey, O. L. (2024). Temperature and biodiversity influence community stability differently in birds and fishes. *Nature Ecology & Evolution*, 8, 1835–1846. <https://doi.org/10.1038/s41559-024-02493-7>.

Grimmelpont, M., Payton, L., Lefrançois, C., & Tran, D. (2024). Molecular and behavioural responses of the mussel *Mytilus edulis* exposed to a marine heatwave. *Marine Environmental Research*, 196, 106418.

Henry, R. P. (1991). Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. In *The carbonic anhydrases: cellular physiology and molecular genetics* (pp. 119-125). Boston, MA: Springer US.

Henriksen, M. V., Arlé, E., Pili, A., Clarke, D. A., García-Berthou, E., Groom, Q., ... & McGeoch, M. A. (2024). Global indicators of the environmental impacts of invasive alien species and their information adequacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 379(1902), 20230323.

Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handler, J., & Goulias, J. (2014). Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevigata* × *Haliotis rubra*). *Aquaculture*, 432, 26-37.

Jeffrey, J. D., Hannan, K. D., Hasler, C. T., & Suski, C. D. (2018). Hot and bothered: effects of elevated Pco₂ and temperature on juvenile freshwater mussels. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 315(1), R115-R127.

Jørgensen, C. B. (1990). *Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology*. Olsen & Olsen.

Jurgens, L. J., & Gaylord, B. (2018). Physical effects of habitat-forming species override latitudinal trends in temperature. *Ecology Letters*, 21, 190-196. <https://doi.org/10.1111/ele.12881>.

Karatayev, A. Y., Boltovskoy, D., Padilla, D. K., & Burlakova, L. E. (2007). The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts. *Journal of Shellfish Research*, 26, 205-213. [[https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\\$205:TIBDPAJ2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26$205:TIBDPAJ2.0.CO;2)](.

Karatayev, A. Y., Boltovskoy, D., Burlakova, L. E., & Padilla, D. K. (2015). Parallels and contrasts between *Limnoperna fortunei* and species of *Dreissena*. *Limnoperna fortunei*: the ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel, 261-297.

Kelley, A. L. (2014). The role thermal physiology plays in species invasion. *Conservation Physiology*, 2, cou045. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou045>.

Kleinbaum, D. G., & Klein, M. (1996). *Survival analysis a self-learning text*. Springer.

Kültz, D., & Somero, G. N. (1995). Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *Journal of experimental biology*, 198(9), 1883-1894.

Lam-Gordillo, O., Douglas, E. J., Hailes, S. F., Cummings, V., & Lohrer, A. M. (2025). Effects of in situ experimental warming on metabolic expression in a soft sediment bivalve. *Scientific Reports*, 15(1), 1812.

Lighton, J. R. (2019). *Measuring metabolic rates: a manual for scientists*. Oxford University Press.

Lugue, K., Monaco, C., Erwan, V., Sham Koua, M., Vidal-Dupiol, J., Mitta, G., & Le Luyer, J. (2024). Exploring thermal tolerance across time and space in a tropical bivalve, *Pinctada margaritifera*. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.04.02.587172>.

Malintha, G. H. T., Woo, D. W., Celino-Brady, F. T., & Seale, A. P. (2023). Temperature modulates the osmosensitivity of tilapia prolactin cells. *Scientific Reports*, 13(1), 20217.

Mansur, M. C. D., Santos, C. P., Darrigran, G., Heydrich, I., Callil, C. T., & Cardoso, F. R. (2003). Primeiros dados quali-quantitativos do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20, 75-84. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752003000100009>.

Masanja, F., Yang, K., Xu, Y., He, G., Liu, X., Xu, X., Xiaoyan, J., Xin, L., Mkuye, R., Deng, Y., & Zhao, L. (2023). Impacts of marine heat extremes on bivalves. *Frontiers in Marine Science*, 10, 1159261. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1159261>.

Matsushima, O., & Kado, Y. (1982). Hyperosmoticity of the mantle fluid in the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana*. *Journal of Experimental Zoology*, 221(3), 379-381.

Mazeaud, M. M., & Mazeaud, F. (1981). Adrenergic responses to stress in fish.

McMahon, R. F., & Bogan, A. E. (2001). Mollusca: bivalvia. *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*, 2, 331-429.

McLachlan, A., & Erasmus, T. (1974). Temperature tolerances and osmoregulation in some estuarine bivalves. *African Zoology*, 9(1), 1-13.

Medeiros, I. P. M., Faria, S. C., & Souza, M. M. (2020). Osmoionic homeostasis in bivalve mollusks from different osmotic niches: Physiological patterns and evolutionary perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 240, 110582.

Miller, L. P., & Dowd, W. W. (2019). Repeatable patterns of small-scale spatial variation in intertidal mussel beds and their implications for responses to climate change. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 236, 110516. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.06.016>.

Miller, N. A., Paganini, A. W., & Stillman, J. H. (2013). Differential thermal tolerance and energetic trajectories during ontogeny in porcelain crabs, genus *Petrolisthes*. *Journal of Thermal Biology*, 38, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.11.005>.

Miller, R. C., & McClure, F. A. (1931). The fresh-water clam industry of the Pearl River. *Lingnan Science Journal*, 10, 307–322.

Miyahira, I. C., Pereira, L. S., & Dos Santos, L. N. (2020). Non-native freshwater molluscs in the Neotropics: what can be learned from Brazilian reservoirs?. *Aquatic Invasions*, 15, 455–472. <https://doi.org/10.3391/ai.2020.15.3.06>.

Morash, A. J., Speers-Roesch, B., Andrew, S., & Currie, S. (2021). The physiological ups and downs of thermal variability in temperate freshwater ecosystems. *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1524-1535.

Morton, B. (1975). The colonization of Hong Kong's raw water supply system by *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) (Bivalvia: Mytilacea) from China. *Malacological Review*, 8, 91–105.

Morton, B. (1996). The aquatic nuisance species problem: a global perspective and review. In F. Dimitri (Ed.), *Zebra mussels and aquatic nuisance species* (pp. 1-54). Ann Arbor Press.

Morton, B. (2015). The Biology and Anatomy of *Limnoperna fortunei*, a Significant Freshwater Bioinvader: Blueprints for Success. In D. Boltovskoy (Ed.), *Limnoperna Fortunei. Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology, vol 10*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_1.

Moutinho, S. (2021). A golden menace. *Science (New York, NY)*, 374(6566), 390-393.

Murano, C., Gallo, A., Nocerino, A., Macina, A., Cecchini Gualandi, S., & Boni, R. (2023). Short-term thermal stress affects immune cell features in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Animals*, 13(12), 1954.

Oliveira, M. D., Campos, M. C., Paolucci, E. M., Mansur, M. C. D., & Hamilton, S. K. (2015). Colonization and spread of *Limnoperna fortunei* in South America. In *Limnoperna fortunei: The ecology, distribution and control of a swiftly spreading invasive fouling mussel*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_19.

Oliveira, M. D., Hamilton, S. K., & Jacobi, C. M. (2010). Forecasting the expansion of the invasive golden mussel *Limnoperna fortunei* in brazilian and north american rivers based on its occurrence in the paraguay river and pantanal wetland of brazil. *Aquatic Invasions*, 5(1), 59-73.

Paolucci, E. M., & Thuesen, L. R. E. V. (2022). Metabolic response to increasing environmental temperature in the invasive mussel *Limnoperna fortunei*. *Austral Ecology*, 47, 818 – 827. <https://doi.org/10.1111/aec.13161>.

Paolucci, E. M., Thuesen, E. V., Cataldo, D. H., & Boltovskoy, D. (2010). Veligers of an introduced bivalve, *Limnoperna fortunei*, are a new food resource that enhances growth of larval fish in the Paraná River (South America). *Freshwater Biology*, 55(9), 1831-1844.

Pastorino, G., Darrigran, G., Martin, S. M., & Lunaschi, L. (1993). *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. *Neotropica La Plata*, 39, 101-102. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/156939>.

Perepelizin, P., & Boltovskoy, D. (2015). Control of *Limnoperna fortunei* Fouling by Thermal Treatments. In D. Boltovskoy (Ed.), *Limnoperna Fortunei*.

Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology, vol 10. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_24.

Perepelizin, P. V., & Boltovskoy, D. (2011a). Hot Water Treatment (Chronic Upper Lethal Temperature) Mitigates Biofouling by the Invasive Asian Mussel *Limnoperna fortunei* in Industrial Installations. *Environmental Science and Technology*, 45, 7868–7873. <https://doi.org/10.1021/es2014852>.

Perepelizin, P. V., & Boltovskoy, D. (2011b). Thermal tolerance of *Limnoperna fortunei* to gradual temperature increase and its applications for biofouling control in industrial and power plants. *Biofouling*, 27, 667-674. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.594504>.

Pereyra, P. J., Rossini, G. B., & Darrigran, G. (2012). Toxicity of neem's oil, a potential biocide against the invasive mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 1065-1071. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000059>.

Ramli, Z., Koh Han, D., Abdullah, F., Eh Rak, A., & Seong Wei, L. (2022). The larval development of the Asian clam, *Corbicula fluminea* in the hatchery. *Agriculture Reports*, 1, 28–38. <https://www.multiscipub.com/index.php/AgricultureReports/article/view/21>.

Raymond, W. W., Tobin, E. D., Barber, J. S., Hayford, H. A., Raymond, A. E., Speck, C. A., ... & Brown, R. (2024). Short-term effects of an unprecedented heatwave on intertidal bivalve populations: fisheries management surveys provide an incomplete picture. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1390763.

Rayssac, N., Pernet, F., Lacasse, O., & Tremblay, R. (2010). Temperature effect on survival, growth, and triacylglycerol content during the early ontogeny of *Mytilus edulis* and *M. trossulus*. *Marine Ecology Progress Series*, 417, 183-191. <https://doi.org/10.3354/meps08774>.

Rebelo, M. F., Afonso, L. F., Americo, J. A., da Silva, L., Neto J. L. B., Dondero, F., & Zhang, Q. (2018). A sustainable synthetic biology approach for the control of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*). *PeerJ Preprints*, 6, e27164v3. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27164v3>.

Roosenburg, W. H., Wright, D. A., & Castagna, M. (1984). Thermal tolerance by embryos and larvae of the surf clam *Spisula solidissima*. *Environmental Research*, 34(1), 162-169. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(84\)90085-9](https://doi.org/10.1016/0013-9351(84)90085-9).

Ruiz, J. L., & Souza, M. M. D. (2008). Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(3), 399-406.

Rutterford, L. A., Simpson, S. D., Jennings, S., Johnson, M. P., Blanchard, J. L., Schön, P. J., Sims, D.W., Tinker, J., & Genner, M. J. (2015). Future fish distributions constrained by depth in warming seas. *Nature Climate Change*, 5(6), 569-573. <https://doi.org/10.1038/nclimate2607>.

Schneider, D. W., Stoeckel, J. A., Rehmann, C. R., Douglas, B. K., Sparks, R. E., & Padilla, D. K. (2003). A developmental bottleneck in dispersing larvae: implications for spatial population dynamics. *Ecology Letters*, 6, 352-360. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00443.x>.

Silva, S. H., Ribolli, J., Simas, S. A., Filho, E. Z., Cardoso, G. F. M., & Nuñez, A. P. O. (2021). *Limnoperna fortunei* - Updating the geographic distribution in the Brazilian watersheds and mapping the regional occurrence in the Upper Uruguay River basin. *Biota Neotropica*, 21, e20201175. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1175>.

Silva, U. M., Fernandes, F. F. C. F., de Holanda, I. B., & Rebelo, M. F. (2013). Invasive species as a threat to biodiversity: The golden mussel *Limnoperna fortunei* approaching the Amazon River basin. *Exploring Themes on Aquatic Toxicology*. Research Signpost, India.

Simberloff, D., Martin, J. L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D. A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pysek, P., Sousa, R., Tabacchi, & Vilà, M. (2013). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(1), 58-66.

Somero, G. N. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and comparative biology*, 42(4), 780-789.

Somma, A., Nogueira, L., & Madina, L. G. (2021). Dinámica larval del mejillón dorado *Limnoperna fortunei* en el embalse de Aguas Corrientes, río Santa Lucía, Uruguay. *Innotec*, 21, 132-152. <https://doi.org/10.12461/21.06>.

Sorte, C. J., Ibáñez, I., Blumenthal, D. M., Molinari, N. A., Miller, L. P., Grosholz, E. D., ... & Dukes, J. S. (2013). Poised to prosper? A cross-system comparison of climate change effects on native and non-native species performance. *Ecology letters*, 16(2), 261-270.

Souza-Bastos, L. R., & Freire, C. A. (2009). The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 289(1-2), 167-174.

Spaccesi, F. (2013). Abundance, recruitment, and shell growth of the exotic mussel *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata (Argentina). *Zoological Studies*, 52, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1810-522X-52-1>.

Specht, J. A., & Fuchs, H. L. (2018). Thermal and viscous effects of temperature on *Mercenaria mercenaria* suspension feeding. *Marine Ecology Progress Series*, 589, 129-140.

Sprague, J. B., & Drury, D. E. (1969). Avoidance reactions of salmonid fish to representative pollutants. *Advance Water Pollution Research*, 2, 169-179.

Sprung, M., & Widdows, J. (1986). Rate of heat dissipation by gametes and larval stages of *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 91, 41-45. <https://doi.org/10.1007/BF00397569>.

Stanley, J. G., & Colby, P. J. (1971). Effects of temperature on electrolyte balance and osmoregulation in the alewife (*Alosa pseudoharengus*) in fresh and sea water. *Transactions of the American Fisheries Society*, 100(4), 624-638.

Strange, K. (2004). Cellular volume homeostasis. *Advances in physiology education*, 28(4), 155-159.

Sunday, J. M., Bates, A. E., & Dulvy, N. K. (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nature Climate Change*, 2, 686-690. <http://dx.doi.org/10.1038/nclimate1539>.

Sylvester, F., Dorado, J., Boltovskoy, D., Juárez, A., & Cataldo, D. (2005). Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiologia*, 534, 71-80. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-1322-3>.

Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., & Massabau, J. C. (2003). Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(4), 914-920.

Tresguerres, M., & Hamilton, T. J. (2017). Acid–base physiology, neurobiology and behaviour in relation to CO₂-induced ocean acidification. *Journal of Experimental Biology*, 220(12), 2136-2148.

Truebano, M., Fenner, P., Tills, O., Rundle, S. D., & Rezende, E. L. (2018). Thermal strategies vary with life history stage. *Journal of Experimental Biology*, 221, jeb171629. <https://doi.org/10.1242/jeb.171629>.

Ungell, A. L., Kiessling, A., & Nilsson, S. (1984). Transfer changes in fish gills during stress. In *Toxins, Drugs, and Pollutants in Marine Animals* (pp. 114-121). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Vargas-Chacoff, L., Regish, A. M., Weinstock, A., & McCormick, S. D. (2018). Effects of elevated temperature on osmoregulation and stress responses in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts in fresh water and seawater. *Journal of Fish Biology*, 93(3), 550-559.

Valles-Regino, R., Mouatt, P., Yee, L. H., & Benkendorff, K. (2022). Ocean warming and heat stress impact molecules of keystone significance in a predatory marine gastropod. *Frontiers in Marine Science*, 9, 830425.

Verdouw, H., Van Echteld, C. J. A., & Dekkers, E. M. J. (1978). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12(6), 399-402.

Vitale, A. M., Monserrat, J. M., Castilho, P., & Rodriguez, E. M. (1999). Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(1), 121-129.

Walker, R. H., Smith, G. D., Hudson, S. B., French, S. S., & Walters, A. W. (2020). Warmer temperatures interact with salinity to weaken physiological facilitation to stress in freshwater fishes. *Conservation Physiology*, 8(1), coaa107.

Weihe, E., & Abele, D. (2008). Differences in the physiological response of inter-and subtidal Antarctic limpets *Nacella concinna* to aerial exposure. *Aquatic Biology*, 4(2), 155-166.

Willmer, P., Stone, G., & Johnston, I. (2009). *Environmental physiology of animals*. John Wiley & Sons.

Wood, C. M., & Munger, R. S. (1994). Carbonic anhydrase injection provides evidence for the role of blood acid-base status in stimulating ventilation after exhaustive exercise in rainbow trout. *Journal of experimental biology*, 194(1), 225-253.

WWF. (2024). *Monitoramento de Lagos da Amazônia Brasileira*. Disponível em: <https://ciencias-wwf.projects.earthengine.app/view/lagos-amazonicos>.

Xia, Z., Barker, J. R., Zhan, A., Haffner, G. D., & Macisaac, H. (2021). Golden mussel (*Limnoperna fortunei*) survival during winter at the northern invasion front implies a potential high-latitude distribution. *Diversity and Distributions*, 27, 1422-1434. <https://doi.org/10.1111/ddi.13289>.

Xu, M. (2015). Distribution and Spread of *Limnoperna fortunei* in China. In D. Boltovskoy (Ed.), *Limnoperna Fortunei. Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology*, vol 10. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_17.

Yao, G. Y., Xu, M. Z., & An, X. H. (2017). Concrete deterioration caused by freshwater mussel *Limnoperna fortunei* fouling. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 121, 55-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.011>.

Zerebecki, R. A., & Sorte, C. J. (2011). Temperature tolerance and stress proteins as mechanisms of invasive species success. *PLOS one*, 6(4), e14806.

Zhang, J., Xu, M., Sun, L., Reible, D., & Fu, X. (2022). Impact of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) colonization on bacterial communities and potential risk to water quality. *Ecological Indicators*, 144, 109499. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109499>.

Zippay, M. L., & Hofmann, G. E. (2010). Physiological tolerances across latitudes: thermal sensitivity of larval marine snails (*Nucella spp.*). *Marine Biology*, 157, 707–714. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1354-3>.