



*Estudo em *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)
em cenários de alterações climáticas, relação entre
disponibilidade de alimento e temperatura*

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

João Maria de Sousa Araújo Zagalo Saraiva

[Novembro 2020]

Peniche

*Estudo em *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758)
em cenários de alterações climáticas, relação entre
disponibilidade de alimento e temperatura*

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

João Maria de Sousa Araújo Zagalo Saraiva

Projeto de Mestrado realizado sob a orientação da Especialista Teresa
Baptista, da Doutora Andreia Rodrigues e do Doutor Rui Rocha

[Novembro 2020]

Peniche

Estudo em *Ruditapes decussatus* em cenários de alterações climáticas, relação entre disponibilidade de alimento e temperatura

Copyright © João Maria de Sousa Araújo Zagalo Saraiva

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche Instituto Politécnico de Leiria

2020

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor.

Agradecimentos

Este trabalho beneficiou da contribuição de várias pessoas, às quais gostaria de agradecer.

Em primeiro lugar, à minha orientadora a Professora Especialista Teresa Batista (Politécnico de Leiria | ESTM - Escola Superior Turismo e Tecnologia do Mar) agradeço ter-me iniciado na área de investigação tão fascinante da Patologia. As suas ideias e correções foram imprescindíveis ao bom termo deste trabalho.

À Doutora Andreia Rodrigues (Universidade de Aveiro) por todo o apoio principalmente nas análises químicas e bioquímicas efetuadas neste trabalho e pelo conhecimento científico.

Ao Doutor Rui Rocha (Universidade de Aveiro) pelo conhecimento científico transmitido e ter facultado o material para o ensaio.

Aos meus amigos e colegas do grupo (Ricardo Passos, Pedro Pires, Paulo Frias, João Duarte, Beatriz Carmo, Rita Sarreira, Carlos Pinto, André Mendes) agradeço todas as conversas e discussões científicas que tivemos e que muito ajudaram, mas especialmente por todo o conhecimento passado e ajuda nas demoradas amostragens.

Finalmente a todos os que me receberam em Peniche de forma tão generosa e honesta, especialmente ao Padre Diogo Maleitas, possibilitando-me fazer este mestrado e à minha família e amigos agradeço o apoio e pela certeza de que eu seria capaz de acabar.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto:

BioDepura – Desenvolvimento de metodologias de depuração de moluscos bivalves adequadas aos requisitos fisiológicos de cada espécie (MAR-02.01.01-FEAMP-0018), financiado pelo Programa MAR2020, Portugal 2020 e União Europeia através do FEAMP -Fundo Europeu dos Assuntos Marítimos e das Pescas;

Resumo

O crescimento populacional tem vindo a aumentar exponencialmente, e com ele uma maior pressão sobre os stocks naturais, que estão cada vez mais sobre explorados e fragilizados. Esta deterioração ambiental tem sido intensificada fortemente pela poluição e efeitos das alterações climáticas, efeitos como o aumento da temperatura da água do mar e disponibilidade de alimento. Os stocks naturais marinhos, estão especialmente suscetíveis a estas alterações, sendo os organismos sésseis e com menor capacidade de movimento os mais afetados, como é o caso da amêijoa *Ruditapes decussatus*, que tem em Portugal uma enorme importância comercial. Vários estudos foram desenvolvidos com estes organismos em relação ao seu comportamento e relação com alterações no meio. Este trabalho visa complementar esta informação avaliando a forma como dois destes fatores, a temperatura e disponibilidade de alimento em conjunto vão afetar as amêijoas desta espécie.

Para este trabalho, as amêijoas foram divididas em seis tratamentos em que dois deles receberam alimento total, dois metade dessa quantidade e os últimos dois permaneceram em jejum, três destes tratamentos (um de cada dieta) foram então expostos a stresse por aumento de temperatura e os outros três mantidos à mesma temperatura. De forma a pudermos atingir os nossos objetivos, foram efetuadas cinco amostragens, nas quais foram retirados seis exemplares de cada tanque: três para análise da resposta imune e análise histologia e outros três para análises de biomarcadores de stresse oxidativo.

Os diferentes efeitos da interação destes dois agentes ambientais na sobrevivência e respostas bioquímicas das amêijoas *R. decussatus* são apresentados e discutidos em detalhe na presente tese. Em resumo, as amêijoas dos tratamentos que sofreram choque térmico apresentaram maior mortalidade, bem como uma maior debilidade do sistema imunitário e maior efeito do stresse oxidativo. A dieta desempenhou um papel crucial na capacidade imunitária e de sobrevivência das amêijoas, sendo notória a diminuição de capacidade de resposta ao choque térmico, nas amêijoas que não receberam alimento total. No entanto as amêijoas que não receberam alimento apresentaram menor mortalidade do que as que tiveram acesso a metade do alimento o que comprova a capacidade destes organismos de resistir a stress ambiental durante curtos períodos (uma semana) recorrendo ao fecho das valvas.

Palavras-chave: Aquacultura, Alterações climáticas, Temperatura, Alimento, Biomarcadores, Sistema imune.

Abstract

Population growth has been increasing exponentially, leading to more significant pressures on natural stocks, which are being gradually overexploited and weakened. This environmental deterioration has been intensified by pollution and the effects of climate change, such as the increase in seawater temperature and changes on food availability. Natural marine stocks are especially susceptible to these changes, with sessile organisms, and those with less capacity of movement, being the most affected, as is the case of clams *Ruditapes decussatus*, which has enormous commercial importance in Portugal. Several studies have been developed with these organisms regarding their behaviour and other physiological responses to environmental changes. This work aims to complement this information by evaluating how two of these factors, the temperature and availability of food, will affect the clams of this species.

For this work, the clams were divided into six treatments in which the food levels varied every two treatments: a full amount of food; half of that amount of food; no food added. Three of these treatments (one from each diet) were then exposed to stress due to temperature increase and the other three kept at the same temperature. In order to achieve our goals, five samplings were made, in which six specimens were taken from each tank: three for analysis of the immune response and histologic analysis and another three for analysis of oxidative stress-related biomarkers.

The effects of the interaction of these two environmental agents in the survival and biochemical responses of the clams *R. decussatus* are presented and discussed in the present thesis. Briefly, clams from treatments that suffered thermal shock showed higher mortality, as well as higher deterioration of the immune system and higher levels of oxidative stress. The diet played a crucial role in the immune response and survival capacity of the clams, with a noticeable decrease in the ability to respond to thermal shock in clams that did not receive total food. However, clams that did not receive food had lower mortality than those that had access to half of the food, which proves the ability of these organisms to resist environmental stress for short periods (one week) resorting to close their valves.

Keywords: Aquaculture, Climate change, Temperature, Food, Biomarkers, Immune system.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Ruditapes decussatus</i>	3
1.1.1. Aquacultura	3
1.1.2. Morfologia	5
1.1.3. Alimentação.....	7
1.1.4. Reprodução	7
1.1.5. Resposta Imune.....	7
1.2. Biomarcadores de Stresse oxidativo.....	8
OBJETIVO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Desenho experimental.....	12
2.2. Rotinas diárias.....	13
2.3. Tratamentos	13
2.4. Indução do choque térmico.....	14
2.5. Amostragem	15
2.6. Resposta imune	16
2.7. Análise Histológica.....	16
2.8. Procedimento analítico	18
2.8.1. Parâmetros de resposta imune medidos na hemolinfa	18
2.8.2 Parâmetros medidos na glândula digestiva	19
2.8.3. Análise histológica.....	20
2.8.4. Análise estatística	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1. Análise histológica.....	22
3.2. Mortalidade	22
3.3. Resposta imune	24
Atividade da Lisozima	24
Atividade da Peroxidase	25
Biomarcadores.....	25
Biomarcador de neurotransmissão.....	26
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Índice de figuras

Figura 1: Mapa de distribuição espécie <i>Ruditapes decussatus</i> - www.aquamaps.org 2019.	1
Figura 2: A: capturas de <i>Ruditapes decussatus</i> a nível mundial; B: aquacultura global de <i>Ruditapes decussatus</i> -FAO 2020.....	4
Figura 3: Exemplos <i>Ruditapes decussatus</i> utilizados na experiência.....	5
Figura 4: Morfologia interna de uma ameijoia boa (<i>Ruditapes decussatus</i>). a-Palpos labiais; b-Musculo adutor anterior; c-Lamela branquial interna; d-Lamela branquial externa; e-Pé; f-ligamento; g-coração; h-musculo adutor posterior; i-aparelho digestivo; j-sifão exalante; k-Sifão inalante; l-Manto; adaptado de Chalhmi, 2015.	6
Figura 5: <i>Ruditapes decussatus</i> com as valvas totalmente fechadas.	10
Figura 6: Sistemas utilizados no ensaio.	12
Figura 7: Esquema dos momentos de amostragem.	15
Figura 8: Cortes histológicos de <i>Ruditapes decussatus</i> . A- Fase I em que não é possível identificar o sexo; B- Fase VI, fêmea; C- Fase VI, macho; 1- oócito reenviado; 2- espermatozoides.	23
Figura 9: Gráfico da mortalidade ocorrida no ensaio com <i>Ruditapes decussatus</i>	24
Figura 10: Mortalidade de <i>Ruditapes decussatus</i> submetido ao ensaio (n = 5). Símbolos diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (P <0,05).	25

Índice de tabelas

Tabela 1: Escala reprodutiva para <i>Ruditapes decussatus</i> , proposto por Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptado por Matias et al (2013).	18
Tabela 2: Parâmetros de resposta imunológica (lisozima; peroxidase) de <i>Ruditapes decussatus</i> submetidos ao ensaio.	28
Tabela 3: Parâmetros de stresse oxidativo (Catalase; glutathione-S-transferases; peroxidação lipídica; atividade da acetilcolinesterase; glutathione total) para <i>Ruditapes decussatus</i> submetidos ao ensaio.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

RAS- aquacultura em sistema de recirculação

SOD- superóxido dismutase

CAT- catalase

GSH - glutathione

GST- glutathione-S-transferases.

LPO- peroxidação lipídica

AChE- atividade da acetilcolinesterase

ROS- espécies reativas de oxigênio

ETS- sistema de transporte de elétrons

MDA- Malondialdeído.

PBS- tampão fosfato salino

FSW- água salgada filtrada

TMB- solução Tetrametilbenzidina

HBSS- Hanks' Balanced Salt Solution

HEWL- hen egg white lysozyme

PMS - sobrenadante pós-mitochondrial

INT- p-iodonitrotetrazólio

OCR- taxa de consumo de oxigênio

TCA- ácido tricloroacético

tGSh- glutathione total

PI- amostragem do período inicial com condições iguais em todos os tratamentos

ACT- amostragem no período anterior ao choque térmico

CH- amostragem no período do choque térmico

PCH- amostragem no período pós-choque térmico

1. INTRODUÇÃO

A população mundial tem crescido exponencialmente, atingindo atualmente os 9 bilhões de pessoas, com os recursos naturais cada vez mais escassos ou indisponíveis devido a sobre-exploração ou às grandes alterações climáticas e poluição, começa a ser um fator cada vez mais preocupante a origem do alimento, para a subsistência sustentável e duradoura da população mundial (FAO, 2020).

A solução para o fornecimento de alimento tem sido a utilização de mananciais marinhos (pesca), agricultura e a aquacultura, sendo esta última no panorama atual, a solução para um caminho mais sustentável e seguro (FAO, 2020; Lima, 2019).

A produção total de peixe em 2018 alcançou um recorde histórico de 179 milhões de toneladas, das quais 88% foram utilizadas para consumo humano direto, graças à captura, relativamente estável, da produção pesqueira, redução de desperdício e crescimento continuado, embora lento, da aquacultura. Esta produção resultou num consumo per capita recorde de 20,5 kg em 2018 (FAO, 2020).

Uma das produções mais rentáveis é a produção de bivalves, sendo que em Portugal a produção é essencialmente constituída por ostras, mexilhões e amêijoas. A produção de amêijoas em Portugal ocupa 87% da produção total, o que equivale a um total de capturas de 1201 toneladas (Lima, 2019). A amêijoa-boia (*Ruditapes decussatus*) pertencente ao filo *Molusca*, classe *Bivalvia*, subclasse *Heterodonta*, ordem *Veneroidea*, superfamília *Veneroidea*, família *Veneridae*, género *Ruditapes*. Habitam as águas costeiras do Mediterrâneo, Atlântico Europeu e Península Ibérica, da Noruega à Somália.

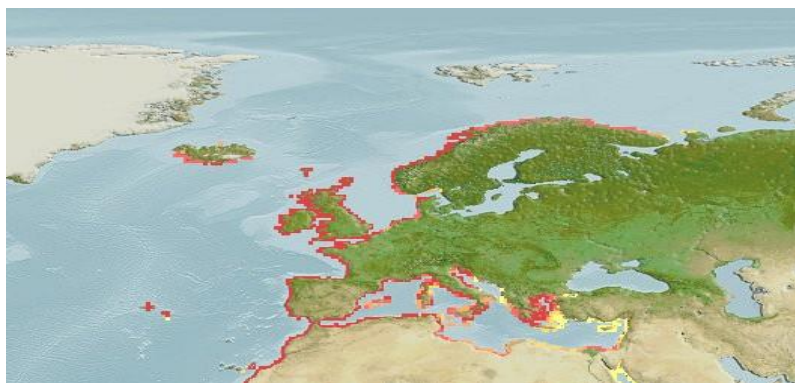


Figura 1: mapa de distribuição espécie *Ruditapes decussatus* - www.aquamaps.org 2019

Em Portugal continental podem ser encontradas na Ria de Aveiro, lagoa de Óbidos, nos estuários do Tejo, Sado e Arade, na Ria de Alvor e Ria Formosa. E está também presente no arquipélago português dos Açores na ilha de São Jorge na lagoa da Fajã de Santo Cristo (Matias, 2013).

É uma espécie eurialina e euritérmica, procuram zonas costeiras protegidas como estuários e lagoas, vivem enterradas no sedimento arenoso ou lodoso em profundidades entre os 15 e 20 cm.

No panorama atual com as alterações climáticas, aparecem novas preocupações que devem ser tidas em consideração. Segundo estudos recentes, prevê-se que vão ocorrer aumentos na temperatura, na acidificação e mudanças na salinidade da água do mar nos próximos 100 anos (Bryndum-Buchholz et al., 2019; Carregosa et al., 2014), bem como a subida do nível médio das águas costeiras (Ortega et al., 2016).

Existe uma crescente preocupação em como estas mudanças vão afetar a vida marinha, especialmente em regiões estuarinas e costeiras, o que afetará não só a economia local, em espécies nativas, como *R. decussatus*, mas também espécies invasoras (Carregosa et al., 2014; Range et al., 2014). A introdução de espécies tem sido um dos principais problemas das últimas décadas, quando se trata de perda de biodiversidade e conservação de ecossistemas, particularmente em ecossistemas aquáticos, onde espécies não nativas conseguem facilmente proliferar, tornando-se assim invasoras, este fenómeno é largamente observado nos bivalves que têm sido introduzidos de forma acidental mas também de forma propositada devido ao seu alto valor económico ou para compensar o colapso das populações nativas (Braga et al., 2017).

Os organismos bivalves são especialmente suscetíveis a alterações do meio, a salinidade tem um grande impacto nas interações hospedeiro-patógeno, resposta imune, alterações metabólicas e fisiológicas e no ritmo endógeno (Carregosa et al., 2014). Estima-se que o pH em 2050 desça cerca de 0,14 do valor atual e em 2100 cerca de 0,3-0,4 do mesmo valor (Freitas et al., 2015). Este decréscimo irá afetar de forma substancial os organismos marinhos, mas em especial os organismos com constituição calcária como os bivalves. Devido ao estado de saturação do carbonato de cálcio, que é essencial para a formação das conchas e estruturas destes organismos e que com estas alterações fica cada vez mais indisponível para estes animais (Freitas et al., 2015; Range et al., 2014). Estas mudanças afetam fortemente as formas larvares e juvenis dos organismos bivalves, mas

também em organismos adultos a exposição a estes fatores de alteração climática (diminuição do pH, aumento da temperatura e CO₂ dissolvido) causa severos malefícios como: a erosão das conchas, o aumento da produção de compostos tóxicos (amônia) e a diminuição da taxa respiratória e metabólica e ainda aumentos na mortalidade (De Marchi et al., 2020; Range et al., 2014).

As lagoas e locais estuarinos, onde as amêijoas *R. decussatus* se encontram fortemente representadas, apesar de serem excelentes locais de produção para estes organismos estão especialmente vulneráveis a fatores de poluição externos como a poluição muito alargada nos sedimentos e água, causada pelas emissões e descargas de poluentes para o ar e diretamente para água por fábricas e indústrias (Esposito et al., 2018; Ortega et al., 2016; Silva et al., 2020).

Deste modo, é de extrema importância controlar que contaminantes estão presentes nestes organismos não só para garantir a sua sobrevivência, mas ainda porque quando contaminados com biotoxinas podem causar intoxicação e doenças graves de origem alimentar no ser humano (Braga et al., 2017).

Os ambientes afetados pelas alterações climáticas, não correm somente o risco de deixar de ter as condições ideais para os organismos originários desses locais. É hoje sabido que com estas alterações, se podem formar as condições ideais para a proliferação de espécies invasoras, mais competitivas que acabam por se instalar e que podem, por competição direta ou indireta, pôr em causa a normal sobrevivência das espécies nativas ou até mesmo causar o seu desaparecimento, podendo ainda trazer para estes novos ambientes: agentes virais, bacterianos e parasitas (Cataudella et al., 2015).

1.1 *Ruditapes decussatus*

1.1.1. Aquacultura

A espécie *R. decussatus* é um dos moluscos mais populares e rentáveis dos locais lagunares e costeiros do Mediterrâneo (Paillard, 2019). Começou inicialmente por ser produzida em Itália onde, desde há muito tempo, era utilizada como fonte de alimento. No entanto, esta produção encontrou vários desafios, acabando por não corresponder às

necessidades de procura, sendo eventualmente substituída por uma espécie semelhante de mais fácil produção a *R. philippinarum* (figura 2)(FAO, 2020).

Ruditapes decussatus tem uma enorme popularidade em Portugal, sendo extensivamente produzida e recolhida, no continente, a amêijoia-boia representa um importante setor económico, com uma produção correspondente a 80% dos moluscos produzidos anualmente, esta produção está fortemente dependente de sementes e organismos recrutados de meio natural (FAO, 2020; Matias et al., 2013).

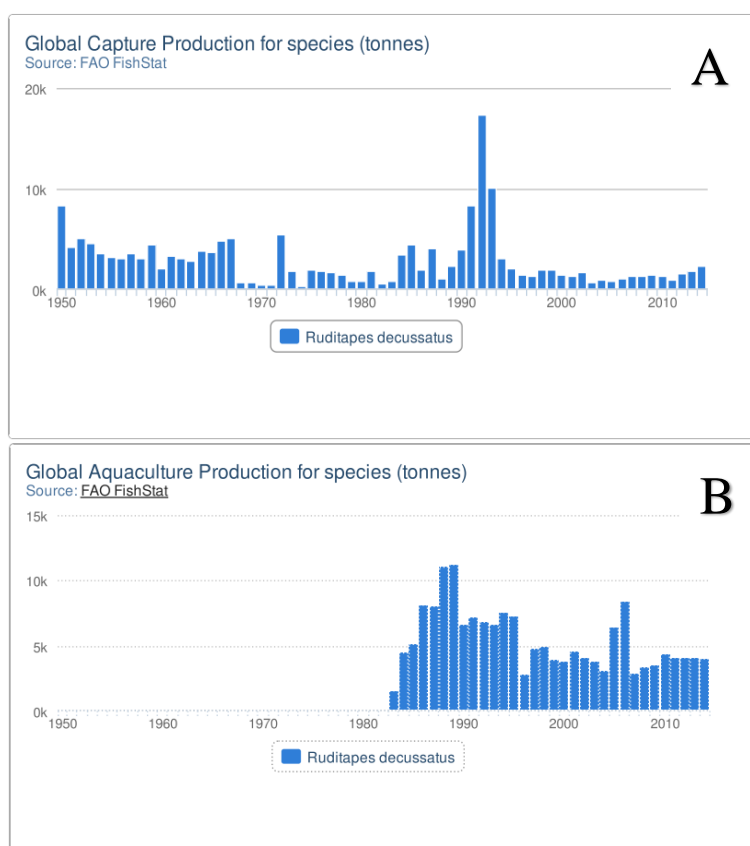


Figura 2: A: Capturas de *Ruditapes decussatus* a nível mundial; B: Aquacultura global de *Ruditapes decussatus* -FAO 2020

As principais áreas de produção desta espécie são a Ria de Aveiro (40 ° 42 ' N; 08 ° ' W) e a Lagoa da Ria Formosa (37 ° 01 ' N; 07 ° 49 ' W). A criação destes moluscos envolve a sementeira de juvenis, recrutados do meio natural, em parcelas mantidas na zona intertidal até atingirem o tamanho comercial. A produção de *R. decussatus* na Ria Formosa representa 90% da produção nacional, tendo um papel fulcral no plano económico desta espécie. No entanto, nas últimas duas décadas, a produção desta espécie tem vindo a diminuir substancialmente devido ao grande recrutamento de juvenis

selvagens e a mortalidades massivas observadas nesta espécie no meio natural (figura 2) (FAO, 2020; Matias et al., 2013a).

1.1.2. Morfologia

Externamente as conchas destes organismos têm a forma arredondada aproximada de um quadrado por terem uma estria e borda concêntricas (figura 3). É possível destacar as linhas de crescimento no lado externo da concha. A cor pode variar entre branco e castanho podendo assumir vários tons e conjuntos de padrões diferentes. No lado interno da concha pode ser observada a linha paleal e marcas abdutoras bem como três dentes cardinais onde se unem as conchas, dentes estes que se encaixam na concha contrária (Chalghmi, 2015; Matias, 2013).



Figura 3: Exemplos *Ruditapes decussatus* utilizados na experiência.

Internamente é possível identificar estruturas bem definidas e distintas (figura 4) como o manto que reveste toda a porção visceral da ameijoia e tem com principal função a segregação da concha, os músculos adutores responsáveis por manterem a concha fechada, dois sifões com pigmentação na extremidade distal, separados em todo o comprimento, sendo esta, uma característica diagnosticante na identificação desta espécie um dos quais é o sifão inalante que permite filtração de água e partículas em suspensão e o outro, exalante usado para a extração de água e resíduos, as brânquias responsáveis pelas trocas gasosas do sistema respiratório e captação de alimento por filtração da água, a massa visceral está dividida em duas partes o pé que é um órgão muito bem definido presente na base da massa visceral tendo como principais funções o movimento tanto horizontal como vertical do animal bem como a fixação deste ao substrato, e a própria massa visceral onde se encontram os sistemas digestivo, nervoso, circulatório e reprodutor (Bebianno et al., 2004; Chalhmi, 2015; Matias, 2013).

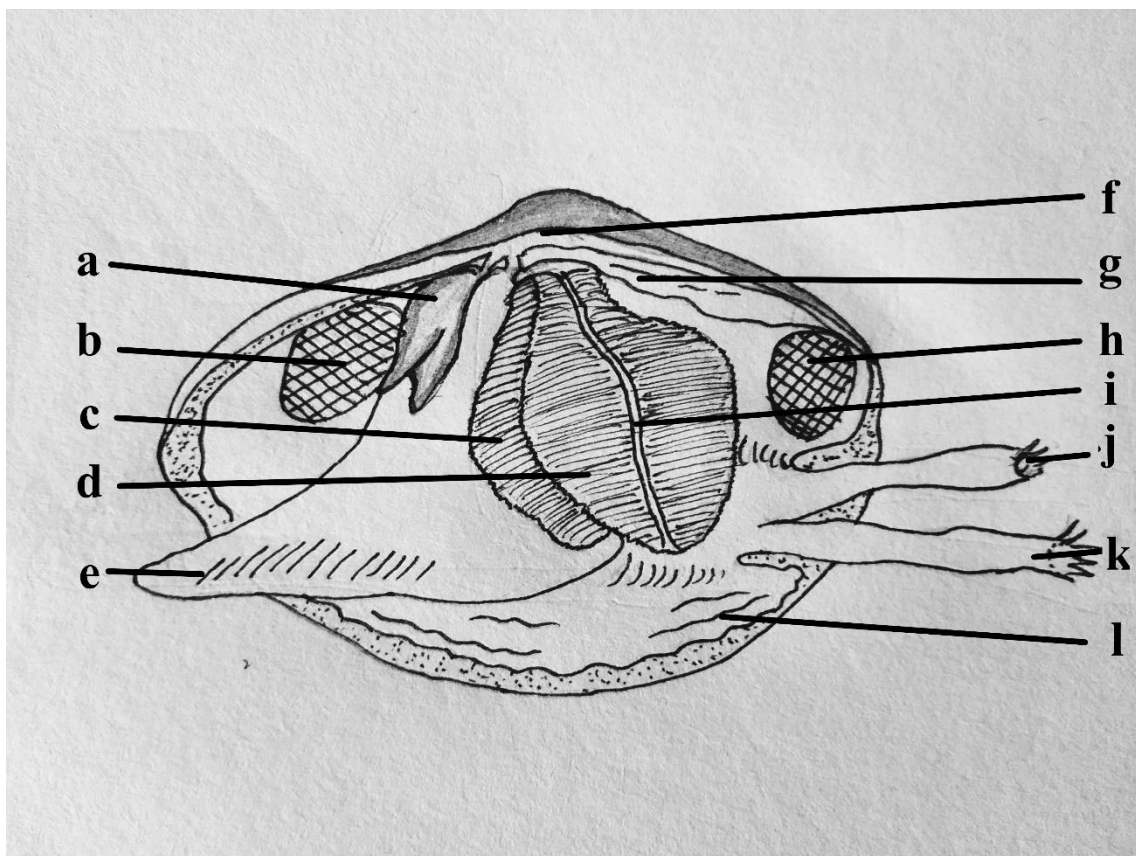


Figura 4- Morfologia interna de uma ameijoia boa (*Ruditapes decussatus*). a-Palpos labiais; b-Musculo adutor anterior; c-Lamela branquial interna; d-Lamela branquial externa; e-Pé; f-ligamento; g-coração; h-musculo adutor posterior; i-aparelho digestivo; j-sifão exalante; k-Sifão inalante; l-Manto; adaptado de Chalhmi, 2015.

Desenho por João Saraiva.

1.1.3. Alimentação

R. decussatus são organismos filtradores alimentando-se de partículas suspensas na água como fitoplâncton, bactérias, larvas e ovos de invertebrados e protistas (Bebianno et al., 2004).

1.1.4. Reprodução

Estes animais são gonocóricos, em que as fêmeas produzem oócitos e os machos espermatozoides, a maturidade sexual não está relacionada com a idade, mas sim com o comprimento do animal, dando-se esta quando o organismo atinge os 20 mm, a fertilização destes organismos é externa, sendo os gametas libertados na coluna de água. Apesar de nos organismos adultos os sexos estarem bem separados alguns autores defendem que existe hermafroditismo nos organismos juvenis antes da gónada estar em estado funcional (Matias, 2013).

1.1.5. Resposta Imune

A amêijoia *R. decussatus*, como organismos invertebrados marinhos, têm apenas resposta imune inata, que envolve componentes celulares e humorais. O sistema imunitário da *R. decussatus*, consiste num sistema de imunidade humoral, mediado por células para reconhecer e responder a patógenos de maneira genérica (Rahman et al., 2019).

É na hemolinfa destes animais que podemos encontrar os hemócitos circulantes. Sabe-se que os hemócitos são na verdade os responsáveis pela maior parte das funções do sistema imune destes organismos, funções como a fagocitose, regeneração de lesões e conchas, digestão e transporte de nutrientes e ainda também um controlo sobre fatores imunes, como lisozima e oxigénio reativo na hemolinfa (Liu and Zhao, 2018; Rahman et al., 2019)

As populações de *R. decussatus*, selvagens e de cativeiro, sofrem com grande regularidade, surtos de grande mortalidade, sendo que em muitos casos não se conhece as causas e não se consegue atuar a tempo de contrariar o surto (Burdon et al., 2014). É então de extrema importância conseguir prevenir estes surtos avaliando as populações (Zannella et al., 2017). Para efetuar esta prevenção é necessário avaliar a capacidade imune das amêijoas, o que pode ser medido pela resposta de parâmetros imunológicos e patológicos (Rahman et al., 2019).

1.2. Biomarcadores de Stresse oxidativo

Os biomarcadores bioquímicos, foram definidos como alterações bioquímicas quantitativas devido a poluentes químicos mensuráveis em meios biológicos, como células, tecidos ou fluidos corporais (McCarthy e Shugart, 2018). Os biomarcadores que respondem à exposição de substâncias xenobióticas, constituem um sistema de alerta precoce de stress químico nos organismos (Bebiano et al., 2004). Os biomarcadores são diferentes em termos de significado e terminologia podendo ser biomarcadores de exposição, resultado, stress, alteração e suscetibilidade. Embora exista uma relação entre a exposição a contaminantes e os efeitos biológicos, pode não se aplicar a todos os biomarcadores a não ser que compartilhem uma via metabólica comum (McCarthy and Shugart, 2018).

Os sistemas de defesa da célula conhecidos são utilizados como biomarcadores, podem ser biomarcadores de defesa antioxidantes que são direcionados contra a toxicidade de espécies reativas de oxigénio que inclui a atividade de certas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferases (GST) (Rodrigues et al., 2015; Saidani et al., 2019), protegendo as células de danos causados pelos radicais livres, particularmente a peroxidação lipídica. Métodos para avaliar o dano causado às células incluem: para o dano oxidativo causado ao nível dos lípidos o teste da peroxidação lipídica (LPO) e da atividade da acetilcolinesterase (AChE) que permite estimar a atividade ou os efeitos causados ao nível da neurotransmissão. A indução de sistemas antioxidantes reflete a adaptação ou reação compensatória à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e uma deficiência nesses mecanismos

pode levar a um efeito tóxico de ROS, ficando os organismos mais suscetíveis ao stress oxidativo (Bebianno et al., 2004; McCarthy and Shugart, 2018).

Assim o estudo de biomarcadores tem sido considerados por vários autores (Bebianno et al., 2004; Chalghmi et al., 2016; Esposito et al., 2018; Lehmann et al., 2007; Matias, 2013; McCarthy e Shugart, 2018; Mzoughi e Chouba, 2012; Rodrigues et al., 2015; Saidani et al., 2019; Siqueira et al., 2009; Snell, 2009) uma forma de avaliar como a integração de fatores bióticos: ciclo reprodutor, crescimento, idade, sexo e fatores abióticos: temperatura, salinidade, pH, dieta, oxigénio dissolvido entre outros, influenciam os organismos e a sua capacidade de resposta.

A exposição a temperaturas elevadas e o conseqüente aumento da atividade respiratória mitocondrial, podem aumentar a atividade das enzimas envolvidas na desintoxicação de espécies reativas de oxigénio (ROS). Entre os marcadores bioquímicos, a enzima superóxido dismutase (SOD) é comumente medida, uma vez que desempenha um papel importante nos mecanismos antioxidantes, catalisando a dismutação dos radicais superóxido em uma molécula menos tóxica (Freitas et al., 2017).

Apesar do aumento da temperatura da água do mar puder conduzir a um aumento da capacidade metabólica dos organismos, pode conduzir também a um aumento do stress oxidativo sofrido pelos mesmos. Este stress oxidativo pode resultar da sobreprodução de ROS devido ao stress térmico, mas também devido ao aumento da atividade respiratória mitocondrial (Freitas et al., 2017; Liu and Zhao, 2018). Para evitar a acumulação destas moléculas, os organismos produzem enzimas antioxidantes que vão diminuir a presença destes contaminantes. No entanto dependendo das condições em que se encontra o organismo as enzimas antioxidantes podem não ser capazes de desintoxicar a ROS, quando isto acontece vai ocorrer a peroxidação lipídica (LPO) (Freitas et al., 2017).

R. decussatus aumenta a sua atividade metabólica a temperaturas mais elevadas (superiores a 21°C), comparativamente a temperaturas mais baixas (inferiores a 17°C), o que se pensa estar relacionado com o aumento da taxa de respiração destes organismos (Freitas et al., 2017; Velez et al., 2017). Estes organismos aumentam a produção de enzimas antioxidantes (SOD) quando expostos a temperaturas elevadas, estas enzimas vão ter uma função de defesa antioxidante, prevenindo danos causados pela temperatura, no entanto podem também conduzir a uma maior atividade do ETS (sistema de transporte de eletrões) em concentrações demasiado altas (Velez et al., 2017).

Apesar de já ter sido documentado nesta espécie a existência de mecanismos de defesa quando expostos a temperaturas elevadas, estes mecanismos mostraram ineficientes quando houve exposição a choques térmicos elevados ou de longa duração (Velez et al., 2017).

No que diz respeito aos bivalves a resposta a agentes de stress, tem de ser observada espécie a espécie (Woodin et al., 2020), pois apesar de algumas medidas serem comuns a várias espécies, existem diferenças significativas na maneira como são aplicadas as mesmas. A ameijoia *R. decussatus* tem capacidade de reagir a períodos de aumento de temperatura no meio natural, como pode ser observado no verão em locais onde as temperaturas são mais altas (como é o caso da região Algarve). Uma das primeiras medidas para contrapor este aumento é o aumento de profundidade no substrato de modo a que, o mesmo sirva de tampão às alterações da temperatura (Woodin e Wetthey, 2016). Sendo por isto necessário a ausência de substrato para realmente avaliar o que acontece aos organismos nos casos em que estão expostos a estes choques térmicos.

Estes organismos têm a capacidade de fechar as valvas (figura 5) quando as condições do meio são adversas, como é o caso do aumento da temperatura, exposição ao ar ou presença de agentes tóxicos na água. Quando este processo acontece os organismos ficam isolados do agente stressor, mas vão sofrer períodos de anaerobiose que levará ao aumento da depressão metabólica (Anestis et al., 2008).



Figura 5: *Ruditapes decussatus* com as valvas totalmente fechadas.

Estes organismos têm a capacidade de filtrar enormes quantidades de água para a obtenção de nutrientes e oxigénio, este processo ocorre na cavidade paleal sendo posteriormente filtrada pelas brânquias (Matias et al., 2013). Desta forma os órgãos paliais como as brânquias e manto vão ser os primeiros tecidos a entrar em contacto com os agentes contaminantes do exterior. Assim sendo, a cavidade paleal destes organismos é similar à zona buconasal do grandes vertebrados, onde se vão encontrar primeiramente os contaminantes externos (Robledo et al., 2019).

São vários os tecidos que podem ser utilizados para o teste de biomarcadores e stress oxidativo, no entanto, os que têm maior informação são: glândula digestiva por ser um dos tecidos mais sensíveis dos moluscos para combater os efeitos adversos da contaminação dos sedimentos e as brânquias devido ao seu contacto contínuo com a água circundante e quaisquer contaminantes dissolvidos ou ligados a partículas filtradas (Bonnail et al., 2019).

OBJETIVO

Avaliar o efeito da disponibilidade de alimento na resposta ao stresse térmico, através da análise de biomarcadores de stresse oxidativo, dano oxidativo e parâmetros de resposta imune.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho experimental

Recolha dos animais

As 990 ameijoas foram recolhidas dia 13 de novembro de 2019 no Algarve, zona da Fortaleza (37°00'43''N 7°49'34''W).

Sistemas: 6 sistemas RAS de 250L, compostos por 5 tanques de 9 L (Figura 6)



Figura 6: Sistemas utilizados no ensaio.

Condições normais: Temperatura da água $15,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, salinidade $32,2 \pm 0,4$, pH $8,3 \pm 0,1$ e oxigénio dissolvido $8,5 \pm 2,2$ mg/L.

Suplemento alimentar: microalga liofilizada da empresa Necton do género *Isochrysis*. Alimento com aproximadamente 5×10^8 células $\text{ind}^{-1}\text{d}^{-1}$, com peso seco de alimento correspondendo a 4% do peso seco das amêijoas (Abbas et al., 2018; Matias, 2013).

Os indivíduos foram submetidos a quatro dias de jejum antes de iniciar o ensaio. Depois foram alimentados uma vez por dia, para este procedimento foi necessário desligar o escumador durante um período de cinco horas de forma a garantir que o alimento não era removido do sistema, ficando disponível o tempo suficiente para ser consumido.

2.2. Rotinas diárias

As rotinas iniciaram-se com a verificação de ocorrência de mortalidade, retirando-se os mortos e registando os dados biométricos dos mesmos. Depois medição dos parâmetros da água: Salinidade, pH, amónia, nitritos, nitratos, temperatura e oxigénio dissolvido utilizando uma sonda multiparamétrica (YSI Professional series). Depois sifonar o fundo dos tanques para retirar possíveis desperdícios e dejetos e proceder a substituição de 10% da água. Às 11h00m desligar os escumadores e alimentar as amêijoas com a quantidade recomendada, mantendo os mesmos desligados durante 5 horas.

2.3. Tratamentos

Seis tratamentos (A, B, C, D, E e F) com cinco réplicas de 9L, funcionando cada sistema como um grupo de teste.

Foram inseridos em cada replicado 33 indivíduos, sendo o total por grupo de teste de 165 amêijoas.

Tratamento A: organismos mantidos nas condições normais, ou seja, temperatura de 15°C alimentados com a quantidade recomendada (4% do peso seco dos organismos), sendo submetidos a um choque térmico (+10 °C) ao 7º dia após o início da alimentação e assim mantidas até ao fim do ensaio.

Tratamento B: organismos mantidos nas condições normais, temperatura de 15°C alimentados com metade da quantidade recomendada (2% do peso seco dos organismos), sendo submetidos a um choque térmico (+10 °C) ao 7º dia após o início da alimentação e assim mantidas até ao fim do ensaio.

Tratamento **C**: organismos mantidos à temperatura de 15°C, mas sem alimento, sendo posteriormente submetidos a um choque térmico (+10 °C) ao 7º dia após o início da alimentação e assim mantidas até ao fim do ensaio.

Tratamento **D**: organismos mantidos à temperatura de 15°C alimentados com a quantidade recomendada (4% do peso seco dos organismos), até ao fim do ensaio.

Tratamento **E**: organismos mantidos à temperatura de 15°C alimentados com metade da quantidade recomendada (2% do peso seco dos organismos), sendo assim mantidas até ao fim do ensaio.

Tratamento **F**: organismos mantidos à temperatura de 15°C, mas sem alimento até ao fim do ensaio.

2.4. Indução do choque térmico

Da temperatura inicial de 15°C induziu-se um choque térmico de 10°C em 24 horas. Assim sendo, as temperaturas passaram de 15 °C para 25°C como esta esquematizado na figura 7.

2.5. Amostragem

No esquema seguinte encontram-se representados os diferentes momentos de amostragem. O primeiro momento corresponde à chegada dos organismos, o segundo ao período inicial (PI) com as condições iguais para todos os tratamentos, momento em que

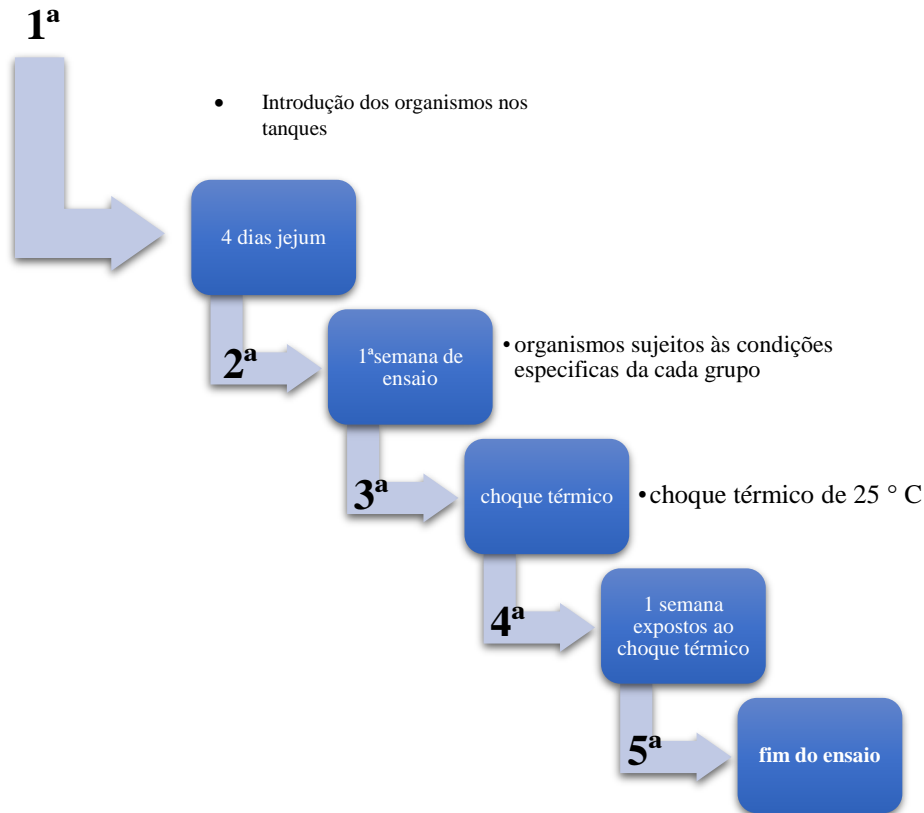


Figura 7: Esquema dos momentos de amostragem

se iniciou o ensaio, a terceira ao período antes do choque térmico (ACT), a quarta ao choque térmico (CH) e quinta após choque térmico (PCT).

Em cada momento de amostragem foram retirados 6 exemplares de cada tanque (3 para análise de resposta imune e 3 para análises de biomarcadores).

2.6. Resposta imune

Anestesia: foi utilizado Cloreto de Magnésio como anestésico, numa concentração de $50\text{g MgCl}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ (600 ml água doce; 400 ml água salgada). Este processo teve uma duração de 16 horas (Silva, 1990).

Procedimento: Num recipiente de volume conhecido, com arejamento, adicionou-se a solução anestésica e posteriormente os bivalves. As amêijoas foram mantidas na solução durante 16h, período necessário para os músculos adutores ficarem totalmente relaxados, permitindo assim que fosse possível recolher a hemolinfa.

Recolha de hemolinfa: foi efetuada a recolha de 500 μl de hemolinfa por indivíduo com uma agulha de calibre 16 e seringa descartável, para a recolha fez-se a inserção da agulha no musculo adutor superior. Posteriormente a amostra recolhida foi centrifugada a $1000 \times g$ durante 10 min, posteriormente retirou-se o sobrenadante, sendo este congelado a -20°C até à realização das análises (Rahman et al., 2019).

2.7. Análise Histológica

Os organismos utilizados para recolher a hemolinfa foram dissecados após a recolha, preservou-se a glândula digestiva de cada indivíduo. Esta foi colocada individualmente em recipientes com 10 ml de solução fixador de Davidson's (Shaw & Battle, 1957), de forma a evitar a decomposição das estruturas celulares, o processo de fixação decorreu durante 48 horas, sendo depois a solução substituída por álcool a 70%, até ao processamento dos tecidos.

Tabela 1: Escala reprodutiva para *Ruditapes decussatus*, proposto por Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptado por Matias et al (2013).

Fase de desenvolvimento	Descrição dos processos fisiológicos
Fase I – Repouso sexual	Os folículos gonadais estão ausentes e o tecido muscular e conetivo ocupa toda a zona, da glândula digestiva ao pé. Não há evidencia de desenvolvimento gonadal e não é possível a determinação do sexo.
Fase I – Início da gametogénese	Folículos e acini gonadal começam a aparecer em fêmeas e machos, respetivamente. Aumentam de tamanho e aparecem cobertos com oócitos na fase de crescimento nas fêmeas e com gametas imaturos (espermatogónia e espermatócitos) nos machos.
Fase III- Gametogénese avançada	Os folículos ocupam grande parte da massa visceral. A presença de tecido muscular e conjuntivo é reduzida. No fim deste estágio, caracterizado pelo crescimento celular intenso em fêmeas, o oócito projeta-se do centro do lúmen, permanecendo preso, através do pedúnculo, A abundância de oócitos livres é igual aos que se encontram unidos a parede do folículo. Nos machos, a maioria dos acini encontra-se cheia de espermatídios e espermatozoides.
Fase IV - Maduro	Corresponde a maturidade, da maioria, dos gametas. Nos oócitos maduros ocorre a rutura do pedúnculo, e, conseqüentemente, os oócitos, ocupam o interior folicular. Nos machos, os acini gonadais contem principalmente espermatozoides
Fase V – Desova parcial	Os gametas são libertados. Dependendo do grau de desova, os folículos estão mais ou menos vazios. As paredes do folículo estão rebentadas. Existem muitos espaços vazios entre e dentro dos folículos.
Fase VI – Pós-desova	Abundante tecido conjuntivo interfolicular. Resíduos ocasionais de espermatozoides ou oócitos reenviados.

Amostragem para Biomarcadores:

Foi retirada a glândula digestiva a cada um dos indivíduos, colocada em microtubos Eppendorf e pesadas individualmente. As amostras foram imediatamente colocadas em azoto líquido de forma garantir a menor deterioração dos tecidos, até à sua utilização, sendo depois mantidos em arca a -80°C.

2.8 Procedimento analítico

2.8.1. Parâmetros de resposta imune medidos na hemolinfa

Atividade da Peroxidase

A atividade da peroxidase (unidades mL⁻¹ de plasma) é determinada segundo o pressuposto de que uma unidade de peroxidase produz uma mudança de absorvância de 1 unidade na densidade ótica. Para esta determinação seguiu-se o método descrito por (Quade and Roth, 1997).

Colocou-se numa microplaca de 96 poços, 15 µL de sobrenadante em 135 µL de HBSS Ca₂⁺, adicionou-se 150 µL de *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) Ca₂⁺ a três poços para serem utilizados como brancos. Posteriormente adicionou-se a cada poço 50 µL da solução TMB 10 mM, seguido de 50 µL da solução H₂O₂. Após 2 min a reação foi parada com 50 µL de H₂SO₄.

Mediu-se então a absorvância a 450 nm no leitor de placas EPOCH2C, BioTek, Winooski, USA.

Atividade da Lisozima

A atividade da lisozima plasmática, foi determinada usando um ensaio turbidimétrico descrito por Costas et al., (2011), para este teste foi preparada uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,5 mg. ML-1, tampão de fosfato de sódio 0,005

M, pH 6,2). Foram adicionados 15 μ L de sobrenadante e 250 μ L da suspensão bacteriana numa microplaca, a reação ocorreu a 25 ° C. A absorbância foi medida a 450 nm, após 0,5 e 4,5 min num leitor de microplacas EPOCH2C (BioTek, Winooski, USA). A curva padrão foi calculada com a lisozima de clara de ovo de galinha liofilizada HEWL (Hen egg white lysozyme), diluída em série em tampão de fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2). A lisozima presente na amostra foi calculada usando a fórmula da curva padrão

2.8.2 Parâmetros medidos na glândula digestiva

Biomarcadores

Os biomarcadores avaliados foram a atividade da catalase (CAT), atividade da glutathione-S-transferase (GST), glutathione total (TG), a peroxidação lipídica (LPO) e a atividade da acetilcolinesterase (AChE) (Bebiano et al., 2004; Rodrigues et al., 2015; Saidani et al., 2019).

Biomarcadores de stresse oxidativo

A concentração proteica do sobrenadante pós-mitocondrial (PMS) foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976), usando a γ -globulina bovina como padrão.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo PMS, medindo a decomposição do substrato H_2O_2 a 240 nm (Clairborne, 1985). Para a atividade da glutathione-S-transferase (GST) determinou-se no PMS após a conjugação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm (Habig et al., 1974).

O conteúdo total de glutathione (TG) foi determinado com a fração PMS a 412 nm, usando uma reação de reciclagem de glutathione reduzida (GSH) com 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) na presença de glutathione redutase (GR) em excesso (Baker et al., 1990; Tietze, 1969). O conteúdo de TG foi calculado como a taxa de formação de TNB^{-2} com um coeficiente de extinção do cromóforo DTNB formado, $\epsilon = 14,1 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ (Baker et al., 1990; Rodrigues et al., 2017).

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada através da medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm (Bird e Draper, 1984).

A carbonilação de proteínas foi medida, pela quantificação de grupos carbonila com base na reação de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com grupos carbonila, de acordo com o método alcalino DNPH descrito por Mesquita et al. (Mesquita et al., 2014). A quantidade de grupos carbonila foi quantificada espectrofotometricamente a 450 nm ($22.308 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ coeficiente de extinção) e os resultados foram expressos em nmol carbonil por mg de proteína.

Biomarcadores neurofisiológicos

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida usando PMS, seguindo o método de Ellman (Ellman et al., 1961) adaptado à microplaca (Guilhermino et al., 1996). O método utiliza acetiltiocololina como substrato após o aumento da absorvância a 412 nm.

2.8.3. Análise histológica

A desidratação e inclusão das amostras em parafina foi feita no processador de tecidos (Leica TP1020, Alemanha).

O corte das amostras foi efetuado num micrótomo (accu-cut® SRM™ Sakura, ALPHen aan den Rijn, Holanda), com espessura de 7 micras, os cortes foram então colocados em lâminas, que foram colocadas a secar numa estufa a 37°C (Binder, Tuttlingen, Alemanha) até serem coradas.

Para a coloração das amostras usou-se Hematoxilina-Eosina. Após a coloração as amostras foram fixadas com o meio de montagem Coverquick 2000 Path® (São Francisco, EUA) e deixadas a secar durante 72 horas. Posteriormente, as preparações dos tecidos foram observadas ao microscópio ótico composto (Leica DM 2000 LED, Wetzlar, Alemanha) e fotografadas (Leica HC 170 HD, Wetzlar, Alemanha).

A fase de desenvolvimento gonadal foi determinada segundo as características observáveis nos cortes, descritas na **Tabela 1**.

2.8.4. Análise estatística

Para a mortalidade foi realizada uma anova de uma via.

Os dados relativos à resposta imune para a lisozima e peroxidase foram expressos como média de oito replicados \pm desvio padrão e os dados relativos aos biomarcadores e à mortalidade foram expressos como média de cinco replicados \pm desvio padrão.

Para os dados do sistema imune, foi realizada uma anova unilateral para os diferentes tratamentos dentro de cada tempo de amostragem e também para os tempos de amostragem dentro de cada tratamento. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado sempre que não havia homogeneidade (recorrendo-se ao teste de Levene)

Nos dados dos biomarcadores, realizou-se uma anova de duas entradas, utilizando como variáveis o momento de amostragem (ACT, CT e PCT) e o tratamento (A, B, C, D, E, F), sendo que quando a interação foi significativa, se realizou uma anova unilateral para os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem. Para os dados tGSH e LPO, foi necessária a realização de uma transformação $\text{Log}(X + 1)$. Realizou-se o teste de Kruskal-Wallis sempre que a premissa não foi atendida (teste de homogeneidade de Levene).

Todos os testes estatísticos foram realizados no software SPSS (v27, IBM, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Análise histológica

Com a análise histológica (**Tabela 2**) foi possível constatar, que a maioria das ameijoas se encontrava na fase **I- repouso sexual** (cerca de 80%) e que as restantes, na fase **VI- fase de pós-desova**.

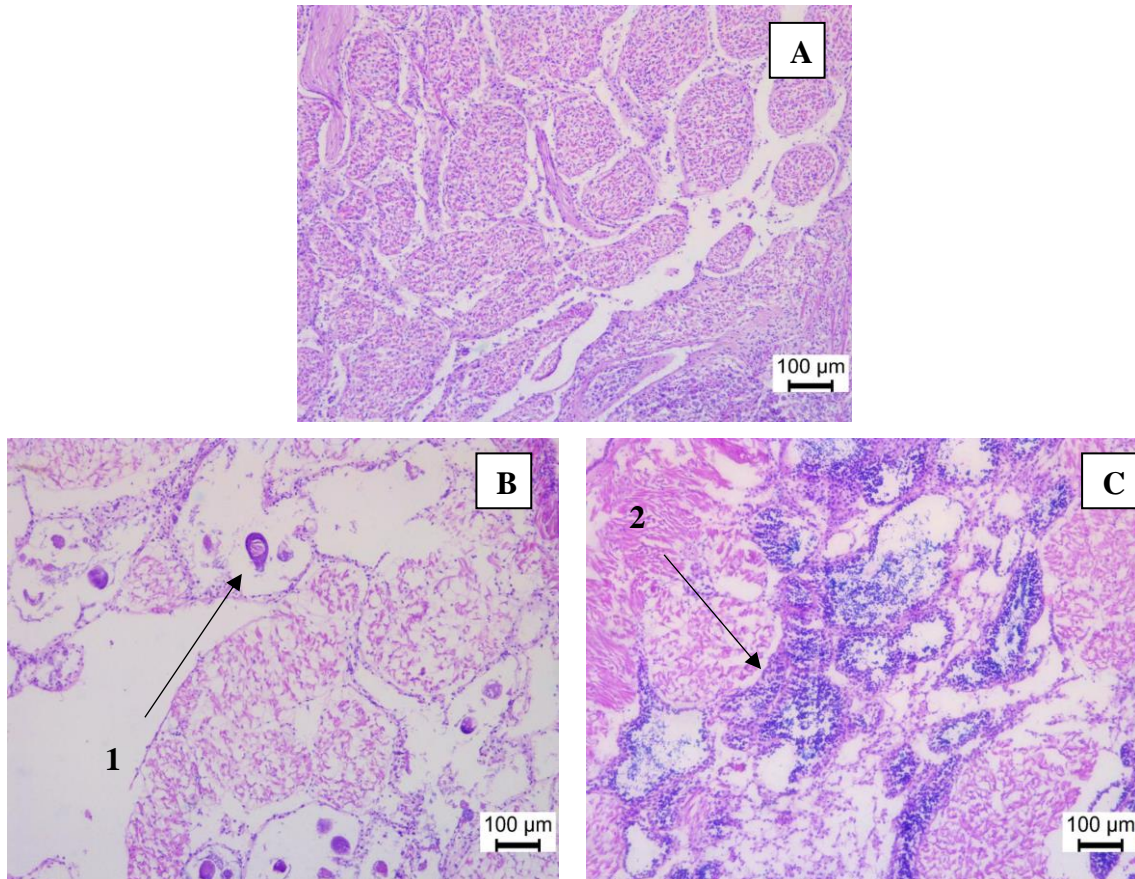


Figura 8: Cortes histológicas de *Ruditapes decussatus*. **A-** Fase I em que não é possível identificar o sexo; **B-** Fase VI, fêmea; **C-** Fase VI, macho; **1-** oócito reenviado; **2-** espermatozoides.

Fotografia: João Duarte.

3.2. Mortalidade

A cinética observada ao longo do ensaio para os diferentes tratamentos, está representada na **figura 9**. Após os 15 dias de ensaio, o tratamento em que se registou maior mortalidade, foi o tratamento B (44,8%).

Durante os primeiros 7 dias de ensaio, em que todos os tratamentos se encontravam à mesma temperatura (15°C), mas com alimentação diferente (A e D – alimentação 4% ; B e E – alimentação 2%; e C e F- sem alimento), o tratamento em que se observou maior mortalidade foi o tratamento C seguido do B e E (2,4%, 1,8% e 0,6% respetivamente).

Nas 24 horas em que foi induzido o choque térmico (aumento de 10 °C da temperatura, dos 15°C para os 25°C) não foi registada mortalidade em nenhum dos tratamentos, no entanto, nos sete dias que se seguiram ao choque térmico em que a temperatura foi mantida a 25°C registou-se um aumento na mortalidade em alguns tratamentos (figura 10), sendo que o tratamento onde ocorreu maior mortalidade foi o B (44,8%), seguido do tratamento A em que se registou pela primeira vez mortalidade (15,8%) e o tratamento C em que a mortalidade atingiu os 4,8%.



Figura 9: Cinética mortalidade ocorrida no ensaio com *Ruditapes decussatus*. A: organismos submetidos a choque térmico e alimentados com 4% do peso seco dos organismos; B: organismos submetidos a choque térmico e alimentados com 2% do peso seco dos organismos; C: organismos submetidos a choque térmico e sem alimento; D: sem choque térmico e alimentados com 4% do peso seco dos organismos; E: sem choque térmico e alimentados com 2% do peso seco dos organismos; F: sem choque térmico e sem alimento.

Nos tratamentos em que a temperatura foi mantida a 15°C ao longo de todo o ensaio o tratamento em que se registou maior mortalidade foi o tratamento D em que morreram 2,4% dos organismos. No tratamento F morreram 0,6% das ameijoas e no tratamento E não foi registada qualquer mortalidade ao longo de todo o ensaio. Foram

observadas diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento B e todos os outros tratamentos e ainda entre o tratamento A e os tratamentos mantidos a 15°C (D, E, F) o que pode ser observado na Figura 10.

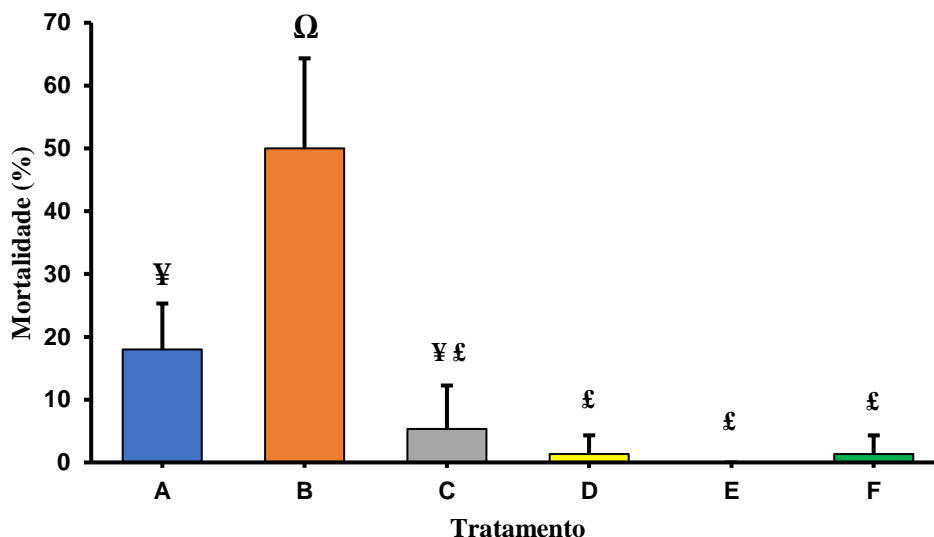


Figura 10: Mortalidade de *Ruditapes decussatus* submetido ao ensaio (n = 5) no final do período experimental. Símbolos diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (P < 0,05). A: organismos submetidos a choque térmico e alimentados com 4% do peso seco dos organismos; B: organismos submetidos a choque térmico e alimentados com 2% do peso seco dos organismos; C: organismos submetidos a choque térmico e sem alimento; D: sem choque térmico e alimentados com 4% do peso seco dos organismos; E: sem choque térmico e alimentados com 2% do peso seco dos organismos; F: sem choque térmico e sem alimento.

3.3. Resposta imune

Atividade da Lisozima

Como pode ser observado na **Tabela 2**, os valores mais elevados para atividade da lisozima, foram registados nos tratamentos C (34,19 μml^{-1}) e F (33,33 μml^{-1}), seguidos dos tratamentos A, D, E e B (31,48; 24,38; 19,99 e 19,68 μml^{-1} , respetivamente).

Nos tratamentos sujeitos ao choque térmico (A, B e C) houve um aumento da atividade da lisozima até à amostragem CT, com exceção do tratamento B em que se observou um aumento até à amostragem ACT, seguido de um pequeno decréscimo para a amostragem CT (de 19,68 μml^{-1} para 19,08 μml^{-1}). Após estes picos de atividade seguiu-se uma diminuição abrupta da mesma até ao fim do ensaio (amostragem PCT).

Para os tratamentos que não foram sujeitos ao aumento da temperatura (D, E e F), a atividade da lisozima aumentou até à amostragem ACT seguido de uma diminuição até ao fim do ensaio.

Note-se que o decréscimo da atividade da lisozima foi substancialmente mais acentuado nos tratamentos sujeitos ao choque térmico, do que nos tratamentos mantido nas mesmas condições de temperatura até ao fim do ensaio.

Identificou-se diferenças estatisticamente significativas entre as amostragens dos tratamentos a 25°C (A, B e C) e ainda no tratamento D.

Atividade da Peroxidase

A atividade da peroxidase apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as amostragens em todos os tratamentos, com a exceção do tratamento D onde não houve diferenças. Entre tratamentos observou-se diferenças significativas entre os tratamentos submetidos a choque térmico (A, B e C) e os tratamentos em que se manteve a temperatura a 15°C (D, E e F) na última amostragem PCT (**Tabela 2**).

Observou-se um aumento da atividade até ao terceiro momento de amostragem (ACT) seguido de um decréscimo durante o resto do período de ensaio.

Os valores máximos, mais elevados, foram registados nos tratamentos C e F (2,62 e 2,25 OD 450nm, respetivamente). Foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos a 25°C e 15°C (A; B; C; e D, E; F; respetivamente)

Biomarcadores

Os resultados obtidos para os biomarcadores podem ser observados na **Tabela 3**.

Na atividade da **Catalase (CAT)** não houve diferenças significativas entre os tratamentos ao longo das amostragens nem nas próprias amostragens.

Para a **glutathione-S-transferase (GST)**, os valores mantiveram-se constantes e relativamente iguais entre todos os tratamentos e amostragens, sendo que o tratamento C

exibiu o maior valor (347,28 nmol/min/mg proteína), na amostragem CT (após o período de 24 horas do choque térmico) sendo este o maior valor obtido.

A **peroxidação lipídica (LPO)**, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos nem nas diferentes amostragens.

No caso **glutathiona total (tGSH)**, é possível constatar um decréscimo ao longo do ensaio para todos os tratamentos, sendo que nos tratamentos que se mantiveram à temperatura de 15°C (D, E e F) este decréscimo começou imediatamente após a amostragem PI, no entanto para os tratamentos que foram sujeitos ao choque térmico e aumento de temperatura (A, B e C), este decréscimo só começou após a amostragem ACT sendo esta a que apresentou valores mais altos. É possível ainda constatar que ao longo de todo o ensaio dentro da mesma amostragem os tratamentos D, E e F, apresentam valores mais baixos do que os tratamentos A, B e C, esta diferença é muito evidente na amostragem ACT. Identificou-se diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos submetidos ao choque térmico e os tratamentos mantidos a 15°C, houve ainda diferenças entre as amostragens para todos os tratamentos com a exceção do tratamento F.

Biomarcador de neurotransmissão

Como biomarcador de neurotransmissão (**Tabela 3**) temos a atividade de **acetilcolinesterase (AChE)**, que não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos, nem entre as diferentes amostragens de cada tratamento.

Tabela 2: Parâmetros de resposta imune (atividade da lisozima; atividade da peroxidase) de *R. decussatus* submetidos a diferentes tratamentos. A: organismos submetidos a choque térmico e alimentados com 4% do peso seco dos organismos; B: organismos submetidos a choque térmico e alimentados com 2% do peso seco dos organismos; C: organismos submetidos a choque térmico e sem alimento; D: sem choque térmico e alimentados com 4% do peso seco dos organismos; E: sem choque térmico e alimentados com 2% do peso seco dos organismos; F: sem choque térmico e sem alimento.

Amostragem		Tratamento					
		A	B	C	D	E	F
Lisozima (µg/mL)	ACT	30,20 ± 12,80 a	19,68 ± 19,44 ac	24,34 ± 15,41 ac	24,38 ± 20,50 a	19,99 ± 11,19	33,33 ± 18,63
	CT	31,48 ± 19,81 a	19,08 ± 10,88 b	34,19 ± 17,91 b	17,91 ± 15,85 bc	17,31 ± 16,92	24,69 ± 20,99
	PCT	6,65 ± 1,24 b	6,25 ± 2,49 c	6,42 ± 1,77 c	5,66 ± 3,23 c	8,00 ± 6,13	12,78 ± 12,19
Peroxidase (OD 450 nm)	ACT	1,70 ± 0,74 a	1,75 ± 1,39 a	2,62 ± 1,90 a	1,63 ± 1,26	1,49 ± 0,78 a	2,25 ± 0,77 a
	CT	1,54 ± 0,86 a	0,71 ± 0,52 b	1,64 ± 0,97 a	0,97 ± 0,69	1,07 ± 0,81 a	1,65 ± 1,24 a
	PCT	0,30 ± 0,11 b¥	0,31 ± 0,10 b¥	0,33 ± 0,08 b¥	0,71 ± 0,54 Ω	0,39 ± 0,22 bΩ	0,64 ± 0,30 b Ω

Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 8), ANOVA unilateral foi realizada para tratamentos dentro de cada tempo de amostragem e para tempos de amostragem dentro de cada tratamento. Os valores na mesma linha com símbolos diferentes são significativamente diferentes (P <0,05), e os valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P <0,05), O teste de Kruskal-Wallis foi realizado sempre que as premissas não foram atendidas.

ACT- antes do choque térmico; CT- choque térmico; PCT- pós-choque térmico;

Tabela 3: Parâmetros de stresse oxidativo (Catalase; glutationa-S-transferases; peroxidação lipídica; atividade da acetilcolinesterase; glutationa total) para *R. decussatus* submetidos ao ensaio. A: organismos submetidos a choque térmico e alimentados com 4% do peso seco dos organismos; B: organismos submetidos a choque térmico e alimentados com 2% do peso seco dos organismos; C: organismos submetidos a choque térmico e sem alimento; D: sem choque térmico e alimentados com 4% do peso seco dos organismos; E: sem choque térmico e alimentados com 2% do peso seco dos organismos; F: sem choque térmico e sem alimento.

	Amostragem	Tratamento						Anova duas entradas		
		A	B	C	D	E	F	Amostragem	Tratamento	Interação
CAT (µmol/min/mg proteína)	ACT	32,56 ± 4,14	24,89 ± 4,49	31,07 ± 4,58	26,82 ± 2,63	31,31 ± 5,84	34,61 ± 5,92	ns	ns	ns
	CT	33,02 ± 6,42	30,57 ± 3,33	31,88 ± 2,38	29,74 ± 5,33	33,13 ± 4,23	28,39 ± 3,80			
	PCT	31,07 ± 2,26	26,75 ± 3,69	30,49 ± 4,25	31,08 ± 5,83	31,39 ± 2,90	33,30 ± 4,89			
GST (nmol/min/mg proteína)	ACT	306,46 ± 33,30	230,91 ± 33,59	273,33 ± 14,86	280,42 ± 56,46	328,89 ± 52,19	286,27 ± 55,49	ns	ns	ns
	CT	259,86 ± 74,77	282,28 ± 38,06	347,28 ± 33,22	279,89 ± 46,48	275,82 ± 34,61	279,66 ± 44,03			
	PCT	246,17 ± 44,21	237,51 ± 44,50	255,91 ± 70,79	247,70 ± 16,18	280,98 ± 53,71	295,34 ± 38,98			
LPO (nmol TBARS/ g tecido)	ACT	18,47 ± 7,72 ¥	14,76 ± 4,04 ¥Ω	11,00 ± 3,70 ¥Ω	13,67 ± 4,01 ¥Ω	13,90 ± 5,82 ¥Ω	8,91 ± 0,94 Ω	ns	*	ns
	CT	17,14 ± 2,95	14,41 ± 3,38	14,05 ± 3,94	11,93 ± 2,67	11,57 ± 3,68	12,44 ± 4,29			
	PCT	14,53 ± 5,84	9,94 ± 2,04	11,09 ± 4,28	11,82 ± 4,05	13,05 ± 2,01	9,94 ± 0,62			
tGSH (nmol/min/mg proteína)	ACT	86,89 ± 8,52 a¥	79,81 ± 8,02 a¥	86,54 ± 26,86 a¥	46,78 ± 6,6 aΩ	49,33 ± 0,96 aΩ	47,93 ± 11,10 Ω	*	*	*
	CT	42,80 ± 6,31 b	40,89 ± 7,79 b	35,24 ± 2,73 b	33,68 ± 9,97 a	33,53 ± 4,10 b	36,76 ± 7,53			
	PCT	30,80 ± 3,97 c	26,01 ± 4,28 c	31,03 ± 10,27 b	22,79 ± 5,34 b	27,42 ± 8,76 b	35,94 ± 8,43			
AChE (nmol/min/mg proteína)	ACT	1,32 ± 0,20	1,07 ± 0,22	1,47 ± 0,26	1,17 ± 0,11	1,31 ± 0,17	1,29 ± 0,13	ns	ns	ns
	CT	1,12 ± 0,11	1,30 ± 0,12	1,44 ± 0,08	1,26 ± 0,19	1,24 ± 0,06	1,44 ± 0,14			
	PCT	1,24 ± 0,10	1,16 ± 0,16	1,73 ± 0,62	1,05 ± 0,17	1,08 ± 0,09	3,93 ± 2,33			

Valores apresentados como média ± desvio padrão (n = 5). Para dados tGSH e LPO, foi realizada uma transformação Log (X + 1).

* P <0,05; ns: não significativo.

a ANOVA de duas entradas: sendo a interação significativa, realizou-se uma ANOVA de uma via para os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem. Os valores na mesma linha com símbolos diferentes são significativamente diferentes (P <0,05), e os valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P <0,05). O teste de Kruskal-Wallis foi realizado sempre que as premissas não foram atendidas.

ACT- antes do choque térmico; CT- choque térmico; PCT- pós-choque térmico;

4. DISCUSSÃO

Os organismos marinhos são especialmente sensíveis a alterações nas condições do ecossistema onde se encontram. Em condições naturais, os animais sésseis, como é o caso da maioria dos bivalves, estão especialmente expostos a estas mudanças por terem pouca ou nenhuma capacidade de deslocação. Com o aquecimento global e as consequências que dele advêm, desde alterações na salinidade, a alterações do pH, o efeito mais claro e previsível, é o aumento da temperatura da água do mar (Bryndum-Buchholz et al., 2019). As amêijoas *R. decussatus* são um produto de grande importância para o mercado nacional (Oliveira et al., 2014) e já foi demonstrado em diversos estudos, que a temperatura e disponibilidade de alimento influenciam fortemente os organismos bivalves, em relação ao seu desenvolvimento larvar e crescimento, que quando conjugado com algum parâmetro exterior, como alterações na salinidade ou pH, pode resultar na diminuição do sistema imunitário ou até mesmo em mortalidade (Costa et al., 2020a; Delgado and Pérez-Camacho, 2007; Gagnaire et al., 2006; Joyner-Matos et al., 2009; Liu et al., 2012; Pronker et al., 2015). No entanto, a forma como a disponibilidade de alimento vai influenciar a capacidade de resposta destes organismos, em cenários de choques térmicos e períodos de elevada temperatura não foi ainda estudada.

Para uma melhor compreensão do estado fisiológico dos organismos, foi efetuada a análise histológica, que mostrou que as amêijoas utilizadas neste ensaio se encontravam apenas em duas fases de desenvolvimento gonadal, 20% na fase de desenvolvimento VI (pós-desova) e a 80% na fase I (repouso sexual), o que está em concordância com estudos efetuados por outros autores, para ameijoas recolhidas no mesmo período do ano, mesma zona geográfica e ainda em locais com condições semelhantes (Matias et al., 2013b; Ojea et al., 2004). As fases em que as amêijoas se encontram, corresponde à altura em que estes organismos estão mais sensíveis e suscetíveis a alterações do meio, devido ao grande gasto energético que sofrem durante a fase de desova que as antecedeu, em que a maioria das suas reservas energéticas são utilizadas (Matias et al., 2013b). Durante todo o desenvolvimento gonadal de *R. decussatus* a disponibilidade de alimento representa um fator de enorme importância para o aumento do ritmo de desenvolvimento. Nas fases em que as amêijoas se encontravam, durante o ensaio, estavam ainda a recuperar do episódio de grande desgaste, sendo assim de grande relevância a disponibilidade de alimento na água (Delgado e Camacho, 2005; Velez et al., 2017).

A mortalidade observada no ensaio foi fortemente influenciada pela temperatura existindo um grande aumento nos tratamentos sujeitos ao choque térmico (A, B e C) em comparação com os tratamentos em que não houve alterações na temperatura (D, E e F). Seria expectável, que ao submeter as amêijoas ao choque térmico e posterior período a 25°C, se observasse maior mortalidade no tratamentos C, a que não foi providenciado alimento, seguido do tratamentos B, em que apenas foi adicionado metade do alimento necessário e por fim o tratamento A que teve a quantidade total de alimento, no entanto o tratamento C apresentou menor mortalidade que A e B. Podemos encontrar a resposta no comportamento “letárgico” que as ameijoas, presentes nos tanques do tratamento C adotaram, marcado por muito pouco movimento e permanência das valvas maioritariamente fechadas. Já foi demonstrado que as ameijoas *R. decussatus*, podem recorrer ao comportamento de fecho das valvas, quando expostas a períodos de escassez de alimento, reduzindo a taxa respiratória e metabólica de forma a diminuir os gastos energéticos associados à respiração (Albentosa et al., 2007; Woodin et al., 2020), da mesma forma que quando expostas a períodos de 25°C, fecham as suas valvas diminuindo a expressão génica associada ao metabolismo mitocondrial e da proteína chaperona molecular, o que lhes permite sobreviver a períodos de elevadas temperaturas (Velez et al., 2017). Como as ameijoas do tratamento C se encontravam em jejum antes do choque térmico, tinham as valvas fechadas ou semifechadas, já se encontravam com comportamento de pequenos gastos energéticos, adequado para a sobrevivência a aumentos da temperatura durante curtos períodos, caso estas condições se mantivessem mais tempo o mais provável era assistirmos a um grande aumento da mortalidade neste tratamento. No tratamento B, apesar do aumento de temperatura, não se registou uma diminuição da atividade das ameijoas, mas o alimento parece não ter sido o suficiente para sustentar estes animais, quando comparados com as ameijoas do tanque A.

O aumento da temperatura da água do mar, pode aumentar a capacidade metabólica e o stress oxidativo dos organismos (Velez et al., 2017). O stress oxidativo pode resultar da sobreprodução de ROS, mas também do aumento da atividade mitocondrial (Velez et al., 2017; Zannella et al., 2017). Para que não ocorra peroxidação lipídica, existem vários processos especializados para desintoxicação de ROS. Estes processos podem ser não enzimáticos como os níveis de glutathione (GSH) ou enzimáticos como a atividade da catalase (CAT), da glutathione peroxidase (GPx), da glutathione S-transferase (GST) e da

lisozima, muito amplamente estudados para avaliar o stress oxidativo e atividade bacteriana em muitos organismos (Campbell e VerCauteren, 2011; Zannella et al., 2017).

Neste estudo não houve diferenças significativas nos valores da atividade da lisozima e catalase entre os tratamentos a 25°C, e os tratamentos mantidos a 15°C. Em concordância com estes resultados, não se observaram alterações significativas nos níveis de dano oxidativo, medido através dos níveis de LPO, entre tratamentos, o que parece sustentar a noção, de estudos anteriores, que as amêijoas *R. decussatus* podem fechar as valvas de forma a resistir ao stress oxidativo (Velez et al., 2017).

Os resultados para tGSH apresentaram diferenças entre os grupos dos tratamentos A, B e C e o grupo dos tratamentos D, E e F, bem como entre as amostragens de todos os tratamentos, com a exceção do tratamento F. Entre os dois grupos, os tratamentos A, B, e C apresentaram os valores mais altos de glutathiona total, que vai atuar de forma a manter a homeostase da célula, que por consequência diminui ou evita os danos infligidos pela peroxidação lipídica. Desta forma sustenta a noção, como indicado em estudos anteriores (Mansour et al., 2020), que *R. decussatus* tem a capacidade de mitigar a insuficiência do sistema imune, recorrendo a defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, como indicam os nossos resultados em que se estabelece uma relação entre os valores obtidos mais altos, nos tratamentos a 25°C e mais baixos nos tratamentos a 15°C para a tGSH e os valores baixos e sem diferenças significativas entre tratamentos para a lisozima e LPO, aspeto este, que em condições agentes stressores diferentes também já foi demonstrada por outros autores (Costa et al., 2020b).

Para a peroxidase foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de tratamentos submetidos à subida da temperatura de 15°C para 25°C (A, B e C) e o grupo dos tratamentos que se mantiveram à mesma temperatura (D, E e F) até ao fim do ensaio, sendo os valores dos tratamentos A, B e C muito inferiores aos valores de D, E e F, demonstrando que o sistema imunitário das ameijoas a 25°C fica debilitado. Existem também, diferenças significativas entre as amostragens de todos os tratamentos, com exceção do tratamento D que foi mantido a 15°C e era alimentado com a dose total de alimento, o que indica que o sistema imunitário é influenciado negativamente pela escassez de alimento durante períodos prolongados (15 dias) como se pode observar nos resultados para os tratamentos E e F, o que está em concordância com estudos efetuados

anteriormente (Albentosa et al., 2007; Burdon et al., 2014; Lobban and Harrison, 2009; Mansour et al., 2020; Tamayo et al., 2015)

No que diz respeito à atividade da acetilcolinesterase (AChE), neste ensaio não houve diferenças significativas entre os tratamentos que sofreram o choque térmico e os que foram mantidos a 15°C, no entanto vários autores afirmam que AChE aumenta com o aumento temperatura e também com a escassez de alimento (Costa et al., 2020a, 2020b; De Marchi et al., 2020; Silva et al., 2020), em relação à temperatura parece ser necessário um maior intervalo de tempo de exposição ao mesmo. Para a disponibilidade de alimento os resultados obtidos estão em concordância com os trabalhos realizados anteriormente em que os resultados mais altos para atividade da acetilcolinesterase, foram observados nos tratamentos em que não foi dado qualquer tipo de alimento (C e F), estabelecendo um relação positiva entre a escassez de alimento e atividade da acetilcolinesterase, e portanto que a conjugação dos dois fatores (aumento de temperatura e escassez de alimento), diminuem a capacidade do sistema imunitário.

5. CONCLUSÃO

O objetivo do trabalho foi cumprido, conseguindo com o mesmo identificar a relação entre a disponibilidade de alimento e a capacidade das amêijoas *R. decussatus* de reagirem a choques térmicos e períodos de exposição a temperatura elevada. Esta relação está também dependente do estado de desenvolvimento gonadal dos organismos, desenvolvimento este que é sazonal e por isso dependendo da altura do ano, as amêijoas vão estar mais ou menos sensíveis a alterações do meio.

A temperatura elevada como fator isolado vai ter influência negativa na capacidade de sobrevivência de *R. decussatus*, como foi demonstrado neste trabalho, esta debilidade do sistema imunitário vai depender não só da temperatura atingida, mas também do tempo de exposição à mesma, apesar das amêijoas possuírem medidas para contrariar estes efeitos como foi demonstrado no tratamento em que não foi dado alimento. No entanto, será expectável que exposições por períodos mais prolongados aumentem os custos metabólicos associados às respostas de defesa imune e antioxidante, o que pode levar um grande aumento na mortalidade destes animais.

No que diz respeito à alimentação, é possível constatar que tem um papel importante na capacidade e boa funcionalidade do sistema imunitário e por isso na capacidade destes organismos reagirem a agentes stressores. No caso de temperaturas elevadas, apesar de não ser o suficiente para impedir que ocorra mortalidade, funciona como agente mitigador dos efeitos causados pela mesma, sendo de extrema importância garantir a boa nutrição de *R. decussatus* nestas condições temperatura.

Podemos concluir que para as alterações climáticas que se avizinham, vai ser cada vez mais recorrente assistir a grandes surtos de mortalidade destes organismo no meio natural, sendo por isso de enorme importância que exista um controlo progressivo da temperatura e disponibilidade de alimento nos locais onde estes organismos estão mais representados de forma a poder controlar e prever estes surtos de mortalidade de forma a tentar mitigá-los através de intervenção, e ainda influenciar a decisão de explorar ou não estes locais. Portanto, nos locais e instalações, onde exista cultura destes organismos deve existir um controlo constante destes fatores.

Os resultados obtidos com este trabalho são de grande interesse e abrem a porta para a possibilidade de se aplicar a mesma metodologia para estudar, com as mesmas condições, o sistema imunitário e comportamentos de *R. decussatus* em alturas do ano diferentes e por isso em estados de desenvolvimento gonadal diferente, de forma a fazer um estudo comparado nestes organismos para cada estação do ano e melhor compreender como varia a capacidade de sobrevivência dos mesmos e como vão ser afetados pelas alterações climáticas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.S.A., El-Wazzan, E., Khafage, A.R., El-Sayed, A.F.M., Abdel Razek, F.A., 2018. Influence of different microalgal diets on gonadal development of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* broodstock. *Aquac. Int.* 26, 1297–1309. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0284-9>
- Albentosa, M., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., Pérez-Camacho, A., 2007. Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 146, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.10.109>
- Anestis, A., Pörtner, H.O., Lazou, A., Michaelidis, B., 2008. Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: Implications for vertical zonation. *J. Exp. Biol.* 211, 2889–2898. <https://doi.org/10.1242/jeb.016782>
- Bebianno, M.J., G ret, F., Hoarau, P., Serafim, M.A., Coelho, M.R., Gnassia-Barelli, M., Rom o, M., 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: A potential bioindicator species. *Biomarkers* 9, 305–330. <https://doi.org/10.1080/13547500400017820>
- Bonnail, E., Riba, I., de Seabra, A.A., DelValls, T. ., 2019. Sediment quality assessment in the Guadalquivir River (SW, Spain) using caged Asian clams: A biomarker field approach. *Sci. Total Environ.* 650, 1996–2003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.346>
- Braga, A.C., Lage, S., Pacheco, M., Rydberg, S., Costa, P.R., 2017. Native (*Ruditapes decussatus*) and non-indigenous (*R. philippinarum*) shellfish species living in sympatry: Comparison of regulated and non-regulated biotoxins accumulation. *Mar. Environ. Res.* 129, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.05.002>
- Bryndum-Buchholz, A., Tittensor, D.P., Blanchard, J.L., Cheung, W.W.L., Coll, M., Galbraith, E.D., Jennings, S., Maury, O., Lotze, H.K., 2019. Twenty-first-century climate change impacts on marine animal biomass and ecosystem structure across ocean basins. *Glob. Chang. Biol.* 25, 459–472. <https://doi.org/10.1111/gcb.14512>

- Burdon, D., Callaway, R., Elliott, M., Smith, T., Wither, A., 2014. Mass mortalities in bivalve populations: A review of the edible cockle *Cerastoderma edule* (L.). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 150, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.04.011>
- Campbell, T.A., VerCauteren, K.C., 2011. Diseases and parasites. *Biol. Manag. White-Tailed Deer* 219–249. <https://doi.org/10.1525/california/9780520233386.003.0012>
- Carregosa, V., Velez, C., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., 2014. Physiological and biochemical responses of three Veneridae clams exposed to salinity changes. *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 177–178, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.08.001>
- Cataudella, S., Crosetti, D., Massa, F., 2015. Mediterranean coastal lagoons: sustainable management and interactions among aquaculture, capture fisheries and the environment. *Organization* 293.
- Chalghmi, H., 2015. étude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde *Ruditapes* sp.
- Chalghmi, H., Zrafi, I., Gourves, P.Y., Bourdineaud, J.P., Saidane-Mosbahi, D., 2016. Combined effects of metal contamination and abiotic parameters on biomarker responses in clam: *Ruditapes decussatus* gills: An integrated approach in biomonitoring of Tunis lagoon. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 895–907. <https://doi.org/10.1039/c6em00139d>
- Costa, S., Coppola, F., Pretti, C., Intorre, L., Meucci, V., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., Solé, M., 2020a. The influence of climate change related factors on the response of two clam species to diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189, 109899. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109899>
- Costa, S., Coppola, F., Pretti, C., Intorre, L., Meucci, V., Soares, A.M.V.M., Solé, M., Freitas, R., 2020b. Biochemical and physiological responses of two clam species to Triclosan combined with climate change scenario. *Sci. Total Environ.* 724, 138143. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138143>
- De Marchi, L., Rocha, R.J.M., Rodrigues, A.C.M., Soares, A.M.V.M., Pretti, C., Chiellini, F., Freitas, R., 2020. Environmental fate of multistressors on carpet shell clam *Ruditapes decussatus*: Carbon nanoparticles and temperature variation.

- Sustain. 12, 1–15. <https://doi.org/10.3390/SU12124939>
- Delgado, M., Camacho, A.P., 2005. Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. *Sci. Mar.* 69, 87–97. <https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69n187>
- Delgado, M., Pérez-Camacho, A., 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Sci. Mar.* 71, 471–484. <https://doi.org/10.3989/scimar.2007.71n3471>
- Esposito, G., Meloni, D., Abete, M.C., Colombero, G., Mantia, M., Pastorino, P., Prearo, M., Pais, A., Antuofermo, E., Squadrone, S., 2018. The bivalve *Ruditapes decussatus*: A biomonitor of trace elements pollution in Sardinian coastal lagoons (Italy). *Environ. Pollut.* 242, 1720–1728. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.098>
- FAO, 2020. The state of World fisheries and aquaculture, Nature and Resources.
- FAO, 2018. The State of Fisheries and Aquaculture in the world 2018, Fao.Org.
- Fernández Robledo, J.A., Yadavalli, R., Allam, B., Pales Espinosa, E., Gerdol, M., Greco, S., Stevick, R.J., Gómez-Chiarri, M., Zhang, Y., Heil, C.A., Tracy, A.N., Bishop-Bailey, D., Metzger, M.J., 2019. From the raw bar to the bench: Bivalves as models for human health. *Dev. Comp. Immunol.* 92, 260–282. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.11.020>
- Freitas, R., Almeida, Â., Calisto, V., Velez, C., Moreira, A., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., 2015. How life history influences the responses of the clam *Scrobicularia plana* to the combined impacts of carbamazepine and pH decrease. *Environ. Pollut.* 202, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.023>
- Freitas, R., De Marchi, L., Bastos, M., Moreira, A., Velez, C., Chiesa, S., Wrona, F.J., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., 2017. Effects of seawater acidification and salinity alterations on metabolic, osmoregulation and oxidative stress markers in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecol. Indic.* 79, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.003>

- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 536–547.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.07.003>
- Joyner-Matos, J., Andrzejewski, J., Briggs, L., Baker, S.M., Downs, C.A., Julian, D., 2009. Assessment of cellular and functional biomarkers in bivalves exposed to ecologically relevant abiotic stressors. *J. Aquat. Anim. Health* 21, 104–116.
<https://doi.org/10.1577/H08-066.1>
- Lehmann, D.W., Levine, J.F., Law, J.M., 2007. Polychlorinated Biphenyl Exposure Causes Gonadal Atrophy and Oxidative Stress in *Corbicula fluminea* Clams. *Toxicol. Pathol.* 35, 356–365. <https://doi.org/10.1080/01926230701230288>
- Lima, F., 2019. estatísticas de pesca 2018. Inst. Nac. Estatística, I. P 1, 43.
- Liu, J., Zhao, Y., 2018. Morphological and functional characterization of clam *Ruditapes philippinarum* haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 82, 136–146.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.019>
- Liu, W., Huang, X., Lin, J., He, M., 2012. Seawater acidification and elevated temperature affect gene expression patterns of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033679>
- Lobban, C.S., Harrison, P.J., 2009. Temperature and salinity. *Seaweed Ecol. Physiol.* 210–240. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511626210.007>
- Mansour, C., Guibbolini, M., Rouane Hacene, O., Saidane Mosbahi, D., Risso-de Faverney, C., 2020. Oxidative Stress and Damage Biomarkers in Clam *Ruditapes decussatus* Exposed to a Polluted Site: The Reliable Biomonitoring Tools in Hot and Cold Seasons. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 78, 478–494.
<https://doi.org/10.1007/s00244-020-00713-2>
- Matias, D., 2013. Domitília da Conceição Coutinha Matias Bases Biológicas e Ambientes para a Optimização da Produção de Amêijoas - *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758).
- Matias, D., Joaquim, S., Matias, A.M., Moura, P., de Sousa, J.T., Sobral, P., Leitão, A., 2013. The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L.,

- 1758) in two Portuguese populations: Implications for management and aquaculture programs. *Aquaculture* 406–407, 52–61.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.030>
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 2018. Biomarkers of environmental contamination, *Biomarkers of Environmental Contamination*.
<https://doi.org/10.1201/9781351070263>
- Mzoughi, N., Chouba, L., 2012. Heavy metals and PAH assessment based on mussel caging in the North coast of Tunisia (Mediterranean sea). *Int. J. Environ. Res.* 6, 109–118.
- Ojea, J., Pazos, A.J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J.L., Abad, M., 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* 238, 451–468.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.022>
- Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, Â., Pereira, M.J., Oliveira, J., Castilho, F., 2014. Bivalve Harvesting and Production in Portugal: An Overview. *J. Shellfish Res.* 32, 911. <https://doi.org/10.2983/035.032.0334>
- Ortega, L., Celentano, E., Delgado, E., Defeo, O., 2016. Climate change influences on abundance, individual size and body abnormalities in a sandy beach clam. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 545, 203–213. <https://doi.org/10.3354/meps11643>
- Paillard, C., 2019. *Ruditapes decussatus*. *FAO Fish. Aquac.* 17, 467–475.
<https://doi.org/10.1051/alr:2004053>
- Pronker, A.E., Peene, F., Donner, S., Wijnhoven, S., Geijssen, P., Bossier, P., Nevejan, N.M., 2015. Hatchery cultivation of the common cockle (*Cerastoderma edule* L.): From conditioning to grow-out. *Aquac. Res.* 46, 302–312.
<https://doi.org/10.1111/are.12178>
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 239–248.
[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00048-2)
- Rahman, M.A., Henderson, S., Miller-Ezzy, P., Li, X.X., Qin, J.G., 2019. Immune response to temperature stress in three bivalve species: Pacific oyster *Crassostrea*

- gigas, Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and mud cockle *Katelysia rhytiphora*. *Fish Shellfish Immunol.* 86, 868–874.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.017>
- Range, P., Chícharo, M.A., Ben-Hamadou, R., Piló, D., Fernandez-Reiriz, M.J., Labarta, U., Marin, M.G., Bressan, M., Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., El Menif, N.T., Dellali, M., Chícharo, L., 2014. Impacts of CO₂-induced seawater acidification on coastal Mediterranean bivalves and interactions with other climatic stressors. *Reg. Environ. Chang.* 14, 19–30. <https://doi.org/10.1007/s10113-013-0478-7>
- Rodrigues, A.C.M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A.M.V.M., Pestana, J.L.T., 2015. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Sci. Total Environ.* 508, 506–513.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.021>
- Saidani, W., Sellami, B., Khazri, A., Mezni, A., Dellali, M., Joubert, O., Sheehan, D., Beyrem, H., 2019. Metal accumulation, biochemical and behavioral responses on the Mediterranean clams *Ruditapes decussatus* exposed to two photocatalyst nanocomposites (TiO₂ NPs and AuTiO₂ NPs). *Aquat. Toxicol.* 208, 71–79.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.003>
- Silva, J.H., 1990. Protocolo de anestesia. *Rev. bras. anesthesiol.*
- Silva, S., Cravo, A., Ferreira, C., Correia, C., Almeida, C.M.M., 2020. Biomarker Responses of the Clams *Ruditapes decussatus* Exposed to a Complex Mixture of Environmental Stressors Under the Influence of an Urban Wastewater Treatment Plant. *Environ. Toxicol. Chem.* 0–2. <https://doi.org/10.1002/etc.4895>
- Siqueira, A.F., Ramos, A.C., Silva, A.G., Melo, D., Vista, B., Velha, V., 2009. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. *Nat. line* 7, 37–42.
- Snell, T., 2009. Assessing toxicity of nanoparticles using *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *Environ. Toxicol.* 26, 146–152. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Tamayo, D., Ibarrola, I., Cigarría, J., Navarro, E., 2015. The effect of food conditioning on feeding and growth responses to variable rations in fast and slow growing spat

- of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 471, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.05.017>
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., 2017. Effects of seawater temperature increase on economically relevant native and introduced clam species. *Mar. Environ. Res.* 123, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.11.010>
- Woodin, S., Wethey, D.S., 2016. Impacts of Sublethal and Lethal High Temperatures on Clams Exploited in European Fisheries. <https://doi.org/10.2983/035.035.0215>
- Woodin, S.A., Wethey, D.S., Olabarria, C., Vázquez, E., Domínguez, R., Macho, G., Peteiro, L., 2020. Behavioral responses of three venerid bivalves to fluctuating salinity stress. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 522, 151256. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151256>
- Zannella, C., Mosca, F., Mariani, F., Franci, G., Folliero, V., Galdiero, Marilena, Tiscar, P.G., Galdiero, Massimiliano, 2017. Microbial diseases of bivalve mollusks: Infections, immunology and antimicrobial defense. *Mar. Drugs* 15. <https://doi.org/10.3390/md15060182>