

**Avaliação do potencial antiviral de extratos em robalos
(*Dicentrarchus labrax*) infetados com o vírus da necrose
nervosa (VNN)**

Mariana Catarina Cameira Vaz

2021

**Avaliação do potencial antiviral de extratos em robalos
(*Dicentrarchus labrax*) infetados com o vírus da necrose
nervosa (VNN)**

Mariana Catarina Cameira Vaz

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Professora Especialista Teresa Baptista

2021

Título: Avaliação do potencial antiviral de extratos em robalos (*Dicentrarchus labrax*)
infetados com o vírus da necrose nervosa (VNN)

Copyright © Mariana Catarina Cameira Vaz

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2021

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o 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 e editor.

Página deixada intencionalmente em branco

Agradecimentos

Durante estes dois últimos anos, tive a possibilidade de trabalhar com GRANDES pessoas, que me ensinaram muitas das técnicas que sei hoje, e com as quais diariamente trabalho...e me fazem descobrir a cada dia a importância da investigação científica no mundo da aquacultura.

Um agradecimento MUITO especial à Professora Teresa, que ao longo deste tempo esteve sempre presente com o seu profissionalismo, focada em ajudar e sempre disponível para ouvir os meus milhares de suposições face aos resultados alcançados! Obrigada Professora ;)

Aos meus paizinhos da Team TB, Pedro e Ricardo, e à mãezinha Damiana, por toda a ajuda, MUITAAA PACIÊNCIA, por todas as conversas e principalmente por todo o profissionalismo e alegria com que diariamente os encontro ;) Obrigada Team Passos *et al.*, (2021) preferida!!! E, claro, obrigada também ao mais recente pai da molecular, o Marco, que todos os dias me aturava sempre com a sua boa disposição e muitaaa paciência para a famosa frase “Marco, posso te fazer uma pergunta”? !! Obrigada também, ao Paulo, Inês, Marina e Mariana do CIIMAR, que foram sem dúvida incansáveis, sempre prontos a responder às minhas dúvidas, e me ensinaram alguns dos segredos da expressão de genes ;)

Todo este percurso, começado ainda na licenciatura não seria possível, sem o apoio incondicional do meu futuro aquacultor preferido...que está sempre pronto a ouvir TUDO, e no final dia, quer seja um bom dia ou não, dá aquele abraço reconfortante, que acalma e me ajuda a continuar com os meus objetivos! Serás sempre o meu Baby Shark, obrigada! Love you. Obrigada à família de Ílhavo por serem sempre tão atenciosos e incríveis, têm todos um lugar especial na minha vida.

Dizem, que a família é o principal pilar da nossa vida, e quem o diz está cheio de razão... Muito obrigada Querida Mãe e Querido Pai, por tudo...todo o investimento na minha carreira, carinho, amor e persistência para ser a cada dia uma pessoa melhor e trabalhadora como vos tenho como exemplo. Obrigada Brother, por todas as palavras de coragem e risos como só nós sabemos ;) Às minhas Queridas Avós, Maria e Ana, que sempre disseram “Quando a Mariana diz que faz uma coisa, só sossega quando a faz...raça da rapariga”. Em especial um grande beijinho à avó Maria, que partiu, mas feliz como sempre o foi.... Obrigada Tia Rosa, Madrinha Gabi, Tia Fernanda, Tio Pereira e Tio Luís que desde sempre foram um pilar MUITO importante para o meu crescimento como estudante, e sempre me impulsionaram a estudar e aprender mais e mais... ;) Tal como, o meu Querido Padrinho Tó Manel, que apesar da sua partida inesperada, será sempre o meu foco de coragem e conquistas, assim como o foi durante a sua curta, e feliz vida. Obrigada Mãe Sara do Oeste, por seres sem dúvida, a MELHOR. Obrigada pequena Lulu, Vicente, Lou e mini adulta Dora, são sorrisos como os vossos que alegram e me fazem ser cada dia mais feliz!

A todos os meus amigos, à minha mais que fantástica Friendzone, um muito obrigada por terem feito parte dos melhores anos da minha vida, a vida de Peniche!

A todos os que fazem parte da minha vida e me fazem muito feliz, um muito
obrigada especial! Da vossa, Mariana Vaz ☺

Página deixada intencionalmente em branco

Abstract

One of the major standstill in the development of aquaculture is related to viral infections, which causes significant economic losses. Nervous necrosis virus (NNV) is responsible for high mortality rates in larval and juveniles of relevant finfish species. Currently, there is no completely effective treatment against this infection, and as such preventive measures need to be applied. As is the case with the integration of antiviral extracts to control and minimize the impact of this infection. This study aimed to evaluate the applicability of extracts with antiviral potential, extract 469 (12 mg/kg) and (6 mg/kg), 558 (306 mg/kg) and (153 mg/kg), 488 (2000 mg/kg) fed to European seabass (*Dicentrarchus labrax*) with 5.30 ± 1.23 g, for 52 days. Then, challenged by immersion with $TCID_{50}=10^6$ /mL of the RGNNV genotype.

In an analysis of how the immune system of *D. labrax* reacts to a NNV infection, no nutritional stress related to the different diets provided was found, due to the similar expression of the *hsp-90* gene between treatments. When analyzing the expression of *irf3*, responsible for the reduction of viral replication, there was a positive regulation in extracts 469 (12 mg/kg), 469 (6 mg/kg), 558 (306 mg/kg) and 488 (2000 mg/kg). After infection, the amount of virus in the brain tissue revealed that the 469 extract (6 mg/kg) was the only one that showed significant differences with the lowest number of viral particles (1.56×10^4), coinciding with the high expression of *irf3* in this same extract, before the infection. The expression of *ighm*, confirmed that none of the extracts had the capacity to neutralize viral particles, coinciding with the registered mortality. These results suggest that the ideal concentration that reduces the amount of viral particles, and with neutralizing capacity, can be found in extract 469 between 6 to 12 mg/kg. More studies are needed to understand exactly how the modulation of the immune system works in the presence of NNV and how the host-pathogen interaction occurs. The provision the supplementation with antiviral immunostimulants may be a promising strategy to prepare the fish immune system and prevent irreversible damage.

Key-words: Aquaculture, Betanodavirus, Immunostimulants, Host-pathogen interactions, Immune system

Página deixada intencionalmente em branco

Resumo

Um dos grandes impasses ao desenvolvimento da aquacultura está relacionado com infecções virais, as quais causam perdas económicas significativas. O vírus da necrose nervosa (VNN) é responsável por elevadas taxas de mortalidade em larvas e juvenis, em importantes espécies de peixes. Atualmente, não existe um tratamento completamente eficaz contra esta infeção, e como tal é necessário que sejam aplicadas medidas preventivas, como é o caso da integração de extratos antivirais para controlar e minimizar o impacto desta infeção. Este estudo teve como objetivo avaliar a aplicabilidade de extratos com potencial antiviral, extrato 469 (12 mg/kg) e (6 mg/kg), 558 (306 mg/kg) e (153 mg/kg), 488 (2000 mg/kg) fornecidos a robalos (*Dicentrarchus labrax*) com $5,30 \pm 1,23$ g, durante 52 dias. Seguido de uma infeção por imersão com $TCID_{50} = 10^6$ /mL do genótipo RGNNV.

Numa análise sobre como o sistema imunitário do *D. labrax* reage a uma infeção com VNN, não se verificou *stress* nutricional relacionado com as diferentes dietas fornecidas, pela expressão semelhante do gene *hsp-90* entre tratamentos. Quando analisada a expressão do *irf3*, responsável pela redução da replicação viral, verificou-se uma regulação estatisticamente positiva nos extratos 469 (12 mg/kg), 469 (6 mg/kg), 558 (306 mg/kg) e 488 (2000 mg/kg). Depois da infeção, a quantidade de vírus no tecido cerebral revelou que o extrato 469 (6 mg/kg) foi o único que apresentou diferenças significativas com o menor número de partículas virais ($1,56 \times 10^4$), coincidente com a elevada expressão do *irf3* neste mesmo extrato, antes da infeção. A expressão do *ighm*, confirmou que nenhum dos extratos teve capacidade de neutralizar partículas virais, o que se verificou pela mortalidade registada. Estes resultados sugerem que a concentração ideal que reduza a quantidade de partículas virais, e com capacidade de neutralização, poderá encontra-se no extrato 469 entre 6 a 12 mg/kg. São necessários mais estudos para perceber exatamente como funciona a modulação do sistema imunitário na presença do VNN e como ocorre a interação do patógeno-hospedeiro. O fornecimento de imunoestimulantes antivirais, podem ser uma estratégia promissora para preparar o sistema imunológico dos peixes e prevenir danos irreversíveis.

Palavras-chave: Aquacultura, Betanodavírus, Imunoestimulantes, Interações patógeno-hospedeiro, Sistema imune

Página deixada intencionalmente em branco

Índice geral

Abstract.....	vii
Resumo	ix
Lista de abreviaturas	xiii
Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxv
I. Introdução.....	1
1. Aquacultura	1
2. Vírus da necrose nervosa (VNN).....	2
2.1. Etiologia	2
2.2. Hospedeiro e distribuição geográfica	3
2.3. Fatores de virulência	4
2.4. Resposta do hospedeiro a uma infecção	5
2.5. Transmissão.....	8
2.6. Patologia.....	9
2.7. Diagnóstico.....	10
2.8. Quimioterapia, vacinação, imunostimulação	11
3. Objetivo	15
II. Metodologia	17
1. Ensaio de alimentação com dieta suplementada com os extratos	17
2. Infecção por imersão	19
3. Performance de crescimento.....	21
4. Análise Hematológica.....	22
5. Parâmetros plasmáticos	23
5.1. Glucose.....	23
5.2. Parâmetros de resposta imune	23
5.2.1. Concentração de lisozima.....	23
5.2.2. Atividade da peroxidase	23
6. Biomarcadores de <i>stress</i> oxidativo	24
6.1. Superóxido dismutase (SOD).....	25
6.2. Catalase (CAT).....	25
6.3. Peroxidação lipídica (LPO).....	26
7. Análise Histológica do cérebro.....	26
8. Expressão de genes	27

9.	Quantificação de vírus	29
10.	Análise estatística	31
III.	Resultados do ensaio de alimentação com dieta suplementada com os extratos	32
1.	Performance de crescimento.....	32
2.	Análise Hematológica.....	33
3.	Parâmetros plasmáticos	34
3.1.	Glucose.....	34
3.2.	Parâmetros de resposta imune	35
3.2.	Parâmetros de resposta imune	35
3.2.1.	Concentração de lisozima.....	35
3.2.2.	Atividade da peroxidase	35
4.	Biomarcadores de <i>stress</i> oxidativo	36
4.1.	Superóxido dismutase (SOD).....	36
4.2.	Catalase (CAT).....	37
4.3.	Peroxidação lipídica (LPO).....	37
5.	Expressão de genes	38
5.1.	Avaliação da quantidade e qualidade do RNA extraído	38
5.2.	Expressão de genes em cada um dos tratamentos	38
IV.	Resultados após a infecção.....	43
1.	Mortalidade.....	43
2.	Parâmetros da resposta imune	43
2.1.	Concentração de Lisozima	43
2.2.	Atividade da Peroxidase.....	44
3.	Análise histológica	45
4.	Quantificação de vírus	46
4.1.	Avaliação da quantidade e qualidade do RNA extraído	46
4.2.	Deteção de Betanodavírus através de eletroforese	46
4.3.	Quantificação de vírus em <i>Real-time</i>	47
V.	Discussão de resultados.....	51
VI.	Conclusão e perspectivas futuras	61
VII.	Referências Bibliográficas.....	63
	Anexos.....	1

Lista de abreviaturas

ABW: Peso corporal médio

actb: Actin- β

AMPs: Peptídeos antimicrobianos

BEI: *Binary ethylenimine*

BFNNV: *Barfin flounder nervous necrosis virus*

BHT: 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol

BoHV-1: Vírus herpes em bovinos

CAT: Catalase

cDNA: *Complementary deoxyribonucleic acid*

Ct: *Threshold cycle*

DGAV: Direção Geral da Alimentação e Veterinária

DGI: Índice de crescimento diário

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

dae: Dias após a eclosão

dpi: Dias após a infecção

dsRNA: *Double - stranded ribonucleic acid*

DTPA: *Diethylenetriaminepentaacetic acid*

EG: Expressão de genes

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Epi-1: Epinedicina-1

EPPO: Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

EUA: Estados Unidos da América

ϵ : Extinção molar

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FCR: Taxa de conversão alimentar

FEAP: Federation of European Aquaculture Producers

F2: *Sense primer*

GOD: Glucose oxidase

HAE: Hematologia

HBSS: *Hanks' Balanced Salt Solution*

H&E: Hematoxilina & eosina

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

hsp-90: *Heat shock protein*

HSV: Vírus herpes simplex

ICTV: Comité Internacional de Taxonomia

IFAT: Anticorpo fluorescente indireto

I IFN: Interferão Tipo I

ifn: Interferão

γ IFN: Interferão tipo II

ighm: *Immunoglobulin mu heavy chain*

ight: *Immunoglobulin tau heavy chain*

Igs: Imunoglobulinas

IgM: Imunoglobulinas M

IHQ: Imunohistoquímica

il-6: Interleucina 6

il-8: Interleucina 8

il-10: Interleucina 10

il-1β: Interleucina 1β

IPMA: Instituto Português do Mar e da Atmosfera

irf3: IFN *regulatory factor 3*

irf7: IFN *regulatory factor 7*

LFB: Biossensor de fluxo lateral

LPO: Peroxidação lipídica

MAVS: *Mitochondrial antiviral signalling*

MCH: Hemoglobina corpuscular média

MCHC: Concentração de hemoglobina corpuscular média

MCV: Volume corpuscular médio

MDA: Malondialdeído

mRNA: Messenger ribonucleic acid

OD: Densidade ótica

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: *Polimerase chain reaction*

PIV: Paragripe viruses

pkr: *dsRNA dependente protein kinase receptor*

POD: peroxidase

qPCR: PCR quantitativo

RAS: Sistema de recirculação de água

RdRp: RNA polimerase dependente de RNA

RGNNV: *Red-spotted grouper nervous necrosis virus*

RI: Resposta imune

RNA: *Ribonucleic acid*

ROS: Espécies reativas de oxigénio

rpm: Rotações por minuto

RT-PCR: *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR: *Quantitative reverse transcription PCR*

R3: Anti-sense primer

SNC: Sistema nervoso central

SPs: Polissacarídeos sulfatados

SO: *Stress oxidativo*

SOD: Superóxido dismutase

SuHV-1: Vírus herpes em suínos

ssRNA: Vírus de RNA de cadeia simples

SJNNV: striped jack nervous necrosis virus

TANK: TRAF family member-associated NF_κB activator

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: *Thiobarbituric acid reactive substances*

TBK1: *TANK-binding kinase 1*

TCA: Ácido tricloroacético

TCID₅₀: *Median Tissue Culture Infectious Dose*

TH1-5: Tilápia hepcidina 1-5

TLRs: *Toll-like receptor*

tlr9: *Toll-like receptor, pathogen recognition*

TMB: 3',5'-tetramethylbenzidine hydrochloride

TNF α : *Tumour necrosis factor α*

TNV: *Turbot nodavirus*

TPNNV: *Tiger puffer nervous necrosis virus*

Tris-HCl: *Trizma hydrochloride*

UV: Ultra-violeta

VER: Encefalopatia e retinopatia viral

VFI: Ingestão voluntária de alimento

VNN: Vírus da necrose nervosa

Wf: Peso final

WG: Peso ganho

Wi: Peso inicial

Página deixada intencionalmente em branco

Lista de Figuras

Figura 1: Captura de peixes e produção em aquacultura no mundo, 1980-2030 (Fonte: FAO, 2020 - The State of World Fisheries and Aquaculture).

Figura 2: Distribuição dos genótipos do Vírus da Necrose Nervosa (VNN) (Fonte: Bandín e Souto, 2020).

Figura 3: Representação esquemática da replicação do genoma de Betanodavírus. O RNA1 codifica RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e RNA2 codifica a proteína do capsídeo. O sub-genômico RNA3 de RNA1 codifica a proteína B2. (Dentro do tracejado encontra-se a síntese da resposta do hospedeiro à infecção de VNN): (1) A proteína endógena Mx pode reter o vírus RdRp para degradação por autofagia e lisossomos; (2) Depois de uma infecção o Interferão (IFN) tipo I (I-IFN) e tipo II (IFN γ) podem desencadear respostas imunes inata e adaptativas e IFN *regulatory factor 3* (irf3) pode reduzir a replicação viral nas células ou peixes infetados; (3) Peptídeos antimicrobianos (AMPs), genes marcadores de células-T, e *Tumour necrosis factor α* (TNF α) são regulados positivamente como ativadores de uma resposta imune; (4) Por fim, os IgM (Imunoglobulinas) e outros anticorpos, podem neutralizar o vírus e prevenir danos maiores, como a morte dos peixes (Fonte: Yang *et al.*, 2021).

Figura 4: Representação esquemática do desenho experimental dos aquários durante o ensaio de alimentação.

Figura 5: representação esquemática do desenho experimental dos aquários durante o ensaio da infecção.

Figura 6: Glucose plasmática em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Figura 7: Atividade da lisozima em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Figura 8: Atividade da peroxidase em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Figura 9: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Figura 10: Atividade da Catalase (CAT) em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Figura 11: Peroxidação lipídica (LPO) em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Figura 12: Expressão quantitativa do gene de referência β -actin (*actb*), no rim cranial de *D. labrax* após o ensaio de crescimento com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão (n = 6). Não foram registradas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Figura 13: Expressão quantitativa do gene de *stress*, *Heat shock protein (hsp-90)* no rim cranial de *D. labrax* após o ensaio de crescimento com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão (n = 6). Não foram registradas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Figura 14: Expressão quantitativa de genes de imunidade inata, (A) TNF receptor/associated factor 3 (*Traf3*); (B) Toll-like receptor, pathogen recognition (*tlr9*); (C) dsRNA dependent protein kinase receptor (*pkr*), no rim cranial de *D. labrax* após ensaio de alimentação com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão (n = 6). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Figura 15: Expressão quantitativa de genes de imunidade inata, (A) *Interleukin 6 (il-6)*; (B) *Interleukin 8 (il-8)*; (C) *Interleukin 10 (il-10)*; (D) *Interleukin 1 β (il-1 β)*, no rim cranial de *D. labrax* após ensaio de alimentação com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão (n = 6). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Figura 16: Expressão quantitativa de genes de imunidade inata, (A) Type I IFN (*ifn*); (B) IFN regulatory factor 3 (*irf3*); (C) IFN regulatory factor 7 (*irf7*), no rim cranial de *D. labrax* após ensaio de alimentação com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão (n = 6). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$)

Figura 17: Expressão quantitativa dos genes de imunidade adaptativa, (A) *Immunoglobulin mu heavy chain* (*ighm*) e (B) *Immunoglobulin tau heavy chain* (*ight*) no rim cranial de *D. labrax* após ensaio de crescimento com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão (n = 6). Não foram registadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Figura 18: Cinética de mortalidade para os peixes infetados com VNN, alimentados com os diferentes tratamentos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (n = 3). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Figura 19: Concentração de lisozima em *D. labrax* ao 7º dia após a infeção com VNN nos diferentes tratamentos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (n = 3). Existem diferenças estatisticamente significativas, quando apresentado o símbolo * num determinado tratamento, em comparação os diferentes momentos da infeção (não-infetados e infetados) ($P < 0,05$).

Figura 20: Atividade da peroxidase em *D. labrax* ao 7º dia após a infeção nos diferentes tratamentos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (n = 3). Existem diferenças estatisticamente significativas, quando apresentado o símbolo * num determinado tratamento, em comparação os diferentes momentos da infeção (não-infetados e infetados) ($P < 0,05$).

Figura 21: Histopatologia do cérebro de *D. labrax* antes e depois da infeção com NNV, H&E. (A) Mesencéfalo normal, constituído pelo *tectum* ótico (TeO) que é composto por seis camadas distintas: (1) *stratum marginale*, (2) *stratum opticum*, (3) *stratum fibroetgriciale*, (4) *stratum album central*, (5) *stratum griseum central* e (6) *stratum periventriculae*, 100x; (B) Mesencéfalo de um peixe infetado, com vacuolização, degeneração e necrose dos neurónios (setas) no *tectum* ótico (TeO) com o (3) *stratum fibroetgriciale*, (4) *stratum album central*, (5) *stratum griseum central* e (6) *stratum periventriculae* visíveis, 100x; (C) Metencéfalo (*cerebellum*) normal, com três camadas

distintas, camada molecular externa (Mol), células de Purkinje (setas) e camada granular interna (CGi), 400x; **(D)** Metencéfalo (*cerebellum*) com degeneração visível nas células Purkinje (setas) camadas molecular externa (Mol) e granular interna (CGi), 200x.

Figura 22: Detecção da presença de Betanodavírus (430bp, Bandín e Souto, 2020) através da utilização do marcador NZYTech Ladder V (NZYTech, Lisboa, Portugal) utilizando amostras de cDNA. **(A)** peixes não-infetados (F1,2,3 – Extrato 469 (12 mg/kg), G1,2,3 - Extrato 469 (6 mg/kg), I1,2,3 - Extrato 488 (2000 mg/kg), L1,2,3 - Extrato 558 (306 mg/kg)) e peixes infetados (A1,2,3 - Extrato 469 (12 mg/kg), D1,2,3 - Extrato 558 (306 mg/kg), E1,2,3 - Extrato 558 (153 mg/kg), H1,2,3 - Extrato 488 (2000 mg/kg)); **(B)** peixes infetados (J1,2,3 – Dieta controlo, M1,2,3 - Extrato 469 (6 mg/kg)) e peixes moribundos (de 1 a 9), **(C)** peixes moribundos (10-25); **(D)** peixes moribundos (26 a 31), e confirmação da presença de vírus em alguns peixes não-infetados (F2, G1, I1, L3) e peixes infetados (A2, D3, E1, H2). **M** – marcador molecular com escala de 100bp; **CN** – controlo negativo, **VNN** – cDNA viral.

Figura 23: Curva padrão do valor médio de Ct de cada uma das amostras, de acordo com as diluições sucessivas de VNN com concentração conhecida de $TCID_{50}=10^6$ /mL.

Figura 24: Quantificação de vírus no cérebro de *D. labrax* infetados, ao 7º dia após a infeção (média \pm desvio-padrão) (n = 3) em cada um dos tratamentos. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Em anexo, figura 1: Integridade de RNA, extraído de rim cranial, observado através de eletroforese em gel de agarose 2%. **(A)** Dieta controlo (amostras 13,1; 13,2; 14,1; 14,2; 15,1; 15,2) **(B)** Extrato 469 (12 mg/kg) (amostras 1,1; 1,2; 2,1; 2,2; 3,1; 3,2); **(C)** Extrato 469 (6 mg/kg) (amostras 4,1; 4,2; 5,1; 5,2; 6,1; 6,2); **(D)** Extrato 558 (306 mg/kg) (amostras 7,1; 7,2; 8,1; 8,2; 9,1; 9,2); **(E)** Extrato 558 (153 mg/kg) (amostras 10,1; 10,2; 11,1; 11,2; 12,1; 12,2); e Extrato 488 (2000 mg/kg) (amostras 16,1; 16,2; 17,1; 17,2; 18,1; 18,2); **M** – marcador.

Em anexo, figura 2: Integridade de RNA, extraído do tecido cerebral e observado através de eletroforese em gel de agarose 2% de cada uma das amostras. **(A)** Peixes não-infetados (F: Extrato 469 (12 mg/kg); G: Extrato 469 (6 mg/kg); I: Extrato 488 (2000 mg/kg); L: Extrato 558 (306 mg/kg)); **(B)** Peixes infetados (A: Extrato 469 (12 mg/kg); D: Extrato 558 (306 mg/kg); E: Extrato 558 (153 mg/kg); H: Extrato 488 (2000 mg/kg)); **(C)** Peixes

infetados (J: Controlo; M: Extrato 469 (6 mg/kg)) e moribundos (1 a 6); **(D)** Peixes moribundos (7 a 21); **M** – marcador.

Página deixada intencionalmente em branco

Lista de Tabelas

Tabela I: Condições utilizadas para a síntese de cDNA, temperatura (°C) e tempo (minutos).

Tabela II: Concentração de RNA (ng/μL), pesos (mg) respectivos raios 260/280nm e 260/230nm para expressão de genes.

Tabela III: Componentes e respectivo volume a adicionar (μL), para a mistura da reação utilizada no qPCR.

Tabela IV: Etapas, número/ciclos de repetições, temperatura (°C) e tempo (minutos ou segundos) para qPCR.

Tabela V: Parâmetros de performance de crescimento, peso inicial (Wi) e final do corpo (Wf), peso corporal médio (ABW), peso ganho (WG), ingestão voluntária de alimento (VFI), índice de crescimento diário (DGI) e taxa de conversão alimentar (FCR) em *D. labrax*, alimentados durante 52 dias com diferentes tratamentos. Os valores estão expressos com média ± desvio-padrão (n = 42 para o peso inicial e final do corpo) (n = 3 para WG, VFI, DGI e FCR). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Tabela VI: Perfil hematológico, eritrócitos, leucócitos, hematócrito, hemoglobina, MCV (Volume corpuscular médio), MCH (Hemoglobina corpuscular média), MCHC (Concentração de hemoglobina corpuscular média), trombócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos em *D. labrax*, alimentados durante 52 dias com diferentes tratamentos. Os valores estão expressos com média ± desvio-padrão (n = 6). Diferentes letras em cada linha representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Em anexo, tabela I: Lista de genes, temperatura de *annealing* (°C), *amplicon length* (bp), eficiência (%) e sequência dos primers (*forward* e *reverse*) para a expressão de genes.

Em anexo, tabela II: Concentração de RNA (ng/μL), pesos (mg) respectivos raios 260/280nm e 260/230nm para expressão de genes.

Em anexo, tabela III: Fotografias dos peixes moribundos alusivas aos sinais clínicos observados.

Em anexo, tabela IV: Concentração de RNA (ng/ μ L), pesos (mg) e respectivos rácios 260/280nm e 260/230nm para quantificao de vírus.

I. Introdução

1. Aquacultura

Nas últimas décadas, o consumo de peixe proveniente de recursos pesqueiros, tem aumentando consideravelmente. O peixe é um alimento que contém uma enorme fonte de proteínas, vitaminas, minerais e ácidos gordos polinsaturados. A cultura gastronómica à base de peixe de muitas regiões contribuiu também para o aumento dramático da exploração deste recurso (Carrassón *et al.*, 2021). O consumo global de peixes aumentou em 3,1 % de taxa média anual de 1961 a 2017. Esta taxa é quase o dobro do crescimento mundial anual (1,6 %), durante o mesmo período, e superior a toda a taxa de consumo de outros alimentos proteicos (como carne, laticínios, leite, entre outros) (FAO, 2020). O consumo de peixes para alimentação humana *per capita* cresceu de 9,0 kg (peso vivo equivalente) em 1961 para 20,5 kg em 2018, o que corresponde a um incremento de 1,5 % ao ano (FAO, 2020).

A captura de peixes, para alimentar a população é um recurso natural limitado, que atualmente se encontra ameaçado e em decréscimo constante. Como tal, a aquacultura vem garantir o abastecimento de peixe à população mundial, e esta produção ajuda os recursos selvagens a terem tempo de recuperar e voltar a prosperar, garantindo ao mesmo tempo altos rendimentos no processo produtivo (Long *et al.*, 2019) (Figura 1).

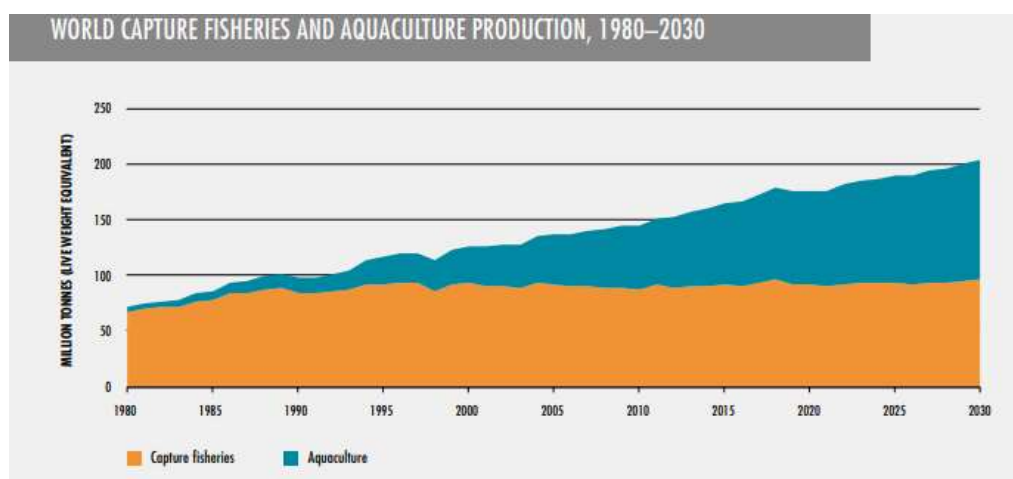


Figura 1: Captura de peixes e produção em aquacultura no mundo, 1980-2030 (Fonte: FAO, 2020 - The State of World Fisheries and Aquaculture).

De acordo com as estatísticas compiladas pela FAO, a produção mundial em aquacultura atingiu recordes históricos de cerca de 114,5 milhões de toneladas (em peso vivo) em 2018. A produção de animais em aquacultura, tem crescido ao longo dos últimos anos, em média cerca de 5,3% ao ano, no período compreendido entre 2001 e 2018. A contribuição da aquacultura a nível mundial para a produção de peixes tem demonstrado um aumento constante (Figura 1), atingindo 46% de 2016 a 2018, excluindo o maior produtor mundial, a China. Já na Europa o crescimento na produção de peixes foi de 17%, em 2018 (FAO, 2020).

O robalo (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) é um dos teleósteos marinhos mais produzidos e comercializados na Europa. É uma espécie que na área mediterrânica apresenta elevado desempenho em termos de crescimento, baixos custos de produção e pode ser produzido em conjunto com outras espécies. Apresenta um sabor agradável e uma boa qualidade nutricional (Vandeputte *et al.*, 2019). Em 2019, de acordo com os dados mais recentes da FEAP (*Federation of European Aquaculture Producers*) (2020), a produção europeia de *D. labrax* foi de 208 197 toneladas. O aumento e intensificação da produção de peixes marinhos em aquacultura levou ao aumento de surtos de doenças infecciosas. As doenças infecciosas, principalmente as doenças virais são um dos principais obstáculos ao desenvolvimento da aquacultura, devido à elevada mortalidade, e perdas económicas muito significativas (Plant e LaPatra, 2011). Têm sido relatadas, em todo o mundo, muitas doenças virais de peixes (Doan *et al.*, 2017), geralmente associadas a elevada mortalidade (atingindo 100%), particularmente em larvas e juvenis (Costa e Thompson, 2016; Bitchava *et al.*, 2019; Zorriehzahra, 2020).

2. Vírus da necrose nervosa (VNN)

2.1. Etiologia

O vírus da necrose nervosa (VNN), é o agente etiológico da encefalopatia e retinopatia viral (VER), também conhecida como necrose nervosa viral (Bandín e Souto, 2020). O Comité Internacional de Taxonomia (ICTV) incluiu os nodavírus dentro do género *Betanodavirus*, pertencente à família *Nodaviridae* (Ball *et al.*, 2000). O VNN é um vírus de RNA de cadeia simples (ssRNA), sem envelope, com um capsídeo icosaédrico, com 25-30 nm de diâmetro. É composto principalmente por dois segmentos RNA1 e RNA2, o RNA1 codifica a RNA polimerase dependente de RNA, e o RNA2 que codifica a proteína do capsídeo (Mori *et al.*, 1992; Delsert *et al.*, 1997). Existem cinco genótipos

deste vírus, o BFNNV (*barfin flounder nervous necrosis virus*), SJNNV (*striped jack nervous necrosis virus*), TPNNV (*tiger puffer nervous necrosis virus*), TNV (*turbot nodavirus*) e o RGNNV (*red-spotted grouper nervous necrosis virus*), sendo que o RGNNV é o que se encontra mais amplamente distribuído (Figura 2) (Nishizawa *et al.*, 1995; Nishizawa *et al.*, 1997; Skliris *et al.*, 2001; Costa e Thompson, 2016). Esta doença foi descrita pela primeira vez no final da década de 1980 na Austrália e no Caribe (Glazebrook e Campbell, 1987; Bellance e Gallet de Saint-Aurin, 1998) e desde então é uma das causas para grandes perdas económicas em aquacultura (Costa e Thompson, 2016).

2.2. Hospedeiro e distribuição geográfica

Após a década de 1990, esta doença tem sido observada e relatada principalmente em peixes marinhos nas águas asiáticas, australianas e europeias (Munday *et al.*, 2002; Ransangan e Manin, 2010; Ransangan e Manin, 2012; Toffan *et al.*, 2016; Abdullah *et al.*, 2017; Doan *et al.*, 2017; NaveenKumar *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Khumaidi *et al.*, 2019). As espécies afetadas incluem o *D. labrax* (Glazebrook e Campbell, 1987; Bellance e Gallet de Saint-Aurin, 1998; Panzarin *et al.*, 2010), a garoupa (*Epinephelus areolatus*) (Sakamoto *et al.*, 2008), a dourada (*Sparus aurata*), o atum (*Thunnus thynnus*) (Bitchava *et al.*, 2019), o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (Gjessing *et al.*, 2009; Krasnov *et al.*, 2013) e do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) (Mao *et al.*, 2015) e alabote do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Grotmol *et al.*, 1995). Através de rotinas realizadas diariamente em diversas aquaculturas, verificou-se a existência de um grande número de indivíduos assintomáticos, que atuam como portadores (Gomez *et al.*, 2004; Panzarin *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2018).

A doença já foi relatada em diversos países do sul e leste da Ásia (China, Índia, Indonésia, Japão, Coreia, Malásia, Tailândia, Vietname), na área Mediterrânica (França, Grécia, Israel, Itália, Malta, Portugal, Espanha, Tunísia), no Reino Unido, Noruega, Caribe e América do Norte (Canadá e Estados Unidos da América (EUA)) (Munday *et al.*, 2002). A classificação de VNN, tem sido amplamente usada para descrever novos isolados de diferentes origens e áreas geográficas (Doan *et al.*, 2017). No entanto, devido à existência de diversidade genética, têm sido observados alguns problemas de identificação de novas estirpes deste vírus (Thiéry *et al.*, 1999; Toubanaki *et al.*, 2015).

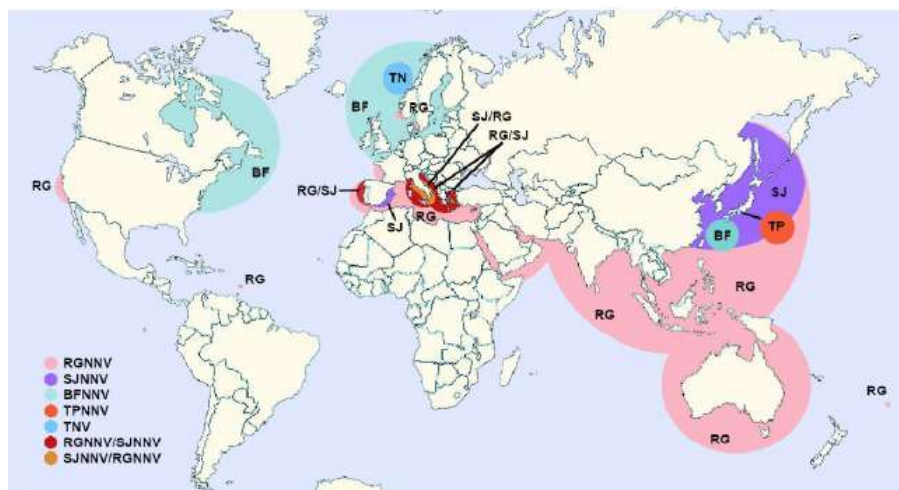


Figura 2: Distribuição dos genótipos do Vírus da Necrose Nervosa (VNN) (Fonte: Bandín e Souto, 2020).

2.3. Fatores de virulência

Nos últimos 30 anos, este vírus tem sido alvo de inúmeros estudos, para se perceber como é a interação vírus-hospedeiro, condições de transmissão, epidemiologia da doença (como por exemplo, o impacto do aquecimento global no desenvolvimento e disseminação da doença), e como controlar a infecção em aquaculturas para diminuir a mortalidade (Bandín e Souto, 2020). O aquecimento global tem vindo a causar sérias modificações nos parâmetros da água, nomeadamente em termos de oxigénio dissolvido, dióxido de carbono oceânico, salinidade e temperatura. Estas, afetam diretamente a saúde animal, resultando numa diminuição do sistema imune e consequente aumento da suscetibilidade a doenças, tanto em peixes selvagens como de aquacultura (de Silva e Soto, 2009; Niedbalski e Fitzner, 2018). As condições de cultivo de cada espécie, podem afetar negativamente os parâmetros da qualidade da água e, consequentemente, comprometer a produção. A virulência do VNN está relacionada com a interação entre o patógeno e o hospedeiro. No patógeno a virulência é definida pelo reconhecimento da célula hospedeira e respetiva entrada, mecanismos de antagonismo do sistema imunológico, e também a eficiência da replicação viral (Moreno *et al.*, 2019). É muito importante que se tenham em consideração estes fatores para se perceber como funciona esta interação (Moreno *et al.*, 2020).

Alguns estudos, focaram-se na região C-terminal da proteína do capsídeo, pois esta está envolvida no reconhecimento da célula do hospedeiro (Iwamoto *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2008). Outros estudos, usaram RGNNV/SJNNV, e fizeram substituições na extremidade 3´terminal de RNA2, os aminoácidos 247 (Ser→Ala, serina→alanina) e 270 (Ser→Asn, serina→asparagina) no capsídeo do genótipo SJNNV, através de genética reversa (mutações). Como resultado destas mutações foi observada uma redução na virulência de cerca de 40%, e diminuição da replicação viral nos neurónios de *S. senegalensis* (Souto *et al.*, 2015a, Labella *et al.*, 2018; Souto *et al.*, 2018a; Moreno *et al.*, 2019; Bandín e Souto, 2020). Souto *et al.*, (2018b) revela que o RNA2 interage com as proteínas celulares do hospedeiro. Moreno *et al.*, (2020), consideram muito importante o papel do capsídeo de aminoácidos nas posições 247 e 270 para determinar a virulência de RGNNV em *D. labrax*. Estes estudos, demonstraram que independentemente do genótipo viral, estas posições estão diretamente envolvidas na virulência de VNN (Moreno *et al.*, 2019).

2.4. Resposta do hospedeiro a uma infeção

Há evidências consideráveis de que quando os peixes se encontram expostos por um longo período de tempo a um fator de *stress*, como densidade elevada, podem ocorrer alterações no sistema imunológico, aumentando a suscetibilidade a doenças infecciosas (Tort, 2011; Costas *et al.*, 2013; Nardocci *et al.*, 2014; Ni *et al.*, 2014), e causando mortalidade.

Após uma infeção com VNN, o vírus entra nas células pelas vias de micropinocitose e macropinocitose (Means *et al.*, 2021). Quando se encontra no citoplasma da célula do hospedeiro, o vírus remove as proteínas do seu capsídeo libertando o genoma viral para iniciar processo de replicação viral através da transcrição e tradução (Yang *et al.*, 2021), provocando a apoptose e necrose de células hospedeiras (Chen *et al.*, 2007). O aglomerar das proteínas do capsídeo, anteriormente libertadas, desencadeiam no hospedeiro um “sinal de morte”, o que lhe permite induzir respostas imunes inatas e ativar anticorpos. A resposta do hospedeiro à infeção ocorre por inúmeras cascatas de sinalização de moléculas intercelulares, desde o reconhecimento das células do hospedeiro e respetiva entrada do vírus, até à indução de respostas imunes inatas. Estas respostas correspondem à primeira linha de defesa em peixes, que exhibe uma resposta rápida e não específica ao patógeno em causa (Bunnoy *et al.*, 2020), incluindo os Interferões Tipo I (I IFN)

responsáveis pelas respostas inflamatórias (Moreno *et al.*, 2018). No final da cascata de sinalização, encontram-se as Imunoglobulinas (Igs), um tipo de resposta imune adaptativa, que contrariamente à resposta imune inata, respondem de forma específica com alta discriminação, e baseadas na memória com longa duração (Burton e Woof, 1992; Whyte, 2007; Bunnoy *et al.*, 2020). Imunoglobulinas M (IgM) são um produto de células B predominante, o qual é considerado a classe mais primitiva de imunoglobulinas identificada nos peixes teleósteos, e pode ser secretado ou expresso na superfície da membrana das células B. As imunoglobulinas são mediadoras humorais produzidas pelos linfócitos B e desempenham um papel fundamental no sistema imunológico adaptativo de vertebrados (Warr, 1995, Whyte, 2007; Bunnoy *et al.*, 2020), para os proteger contra uma ampla gama de patógenos (Du *et al.*, 2016). Os níveis de expressão de IgM são mais elevados no rim cranial, baço e fígado, órgãos que estão envolvidos nas respostas imunes sistêmicas. As imunoglobulinas são ativadas para que o hospedeiro não morra, através da neutralização de partículas virais (Figura 3), tal como já foi observado no robalo asiático (*Lates calcarifer*) e *H. hippoglossus* infetados com VNN (Grove *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2009; Jaramillo *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2021).

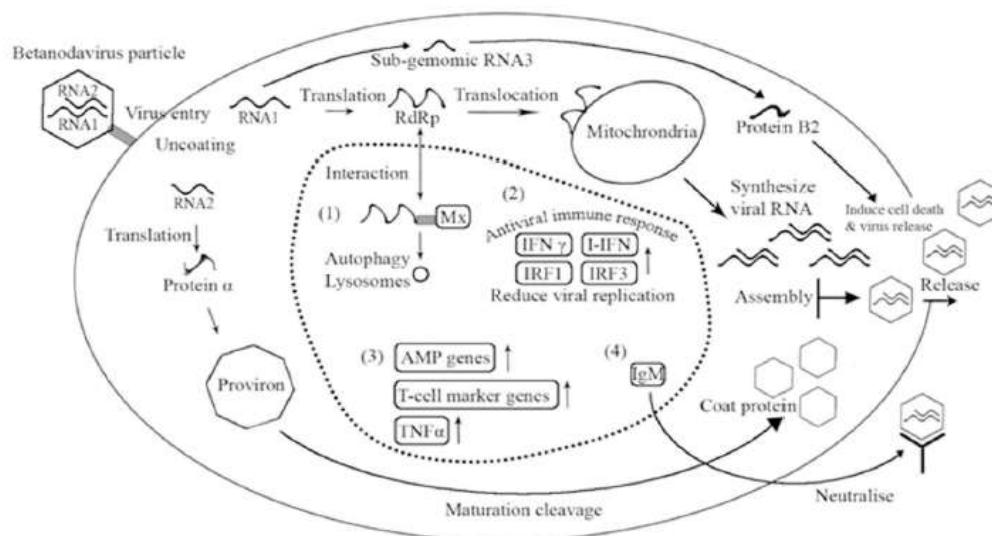


Figura 3: Representação esquemática da replicação do genoma de Betanodavírus. O RNA1 codifica RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e RNA2 codifica a proteína do capsídeo. O sub-genômico RNA3 de RNA1 codifica a proteína B2. (Dentro do tracejado encontra-se a síntese da resposta do hospedeiro à infecção de VNN): (1) A proteína endógena Mx pode reter o vírus RdRp para degradação por autofagia e lisossomos; (2) Depois de uma infecção o Interferão (IFN) tipo I (I-IFN) e tipo II (IFN γ) podem desencadear respostas imunes inata e adaptativas e *IFN regulatory factor 3 (irf3)* pode reduzir a replicação viral nas células ou peixes infetados; (3) Peptídeos antimicrobianos (AMPs), genes marcadores de células-T, e *Tumour necrosis factor α* (TNF α) são regulados positivamente como ativadores de uma resposta imune; (4) Por fim, os IgM (Imunoglobulinas) e outros anticorpos, podem neutralizar o vírus e prevenir danos maiores, como a morte dos peixes (Fonte: Yang *et al.*, 2021).

A lisozima e a peroxidase são importantes enzimas do sistema imunitário. A lisozima é uma proteína bacteriolítica, a qual está envolvida no processo de lise das paredes celulares de bactérias Gram-positivas. A atividade bacteriolítica no muco epidérmico dos peixes e noutros tecidos, contribui para a defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas (Yano, 1997; Palaksha *et al.*, 2008). Esta atividade varia de espécie para espécie, e pode refletir uma resistência diferencial dos peixes a patógenos bacterianos (Fast *et al.*, 2002; Subramanian *et al.*, 2007; Palaksha *et al.*, 2008). A peroxidase utiliza radicais oxidativos para produzir ácido hipocloroso, com a função de eliminar patógenos (Nayak, 2010). Esta enzima atua como um importante agente microbicida que forma H₂O₂ (peróxido de hidrogénio) (Guardiola *et al.*, 2014).

O *stress* oxidativo é um componente muito importante de resposta em organismos marinhos, quando se encontram expostos a uma variedade de *stressores* ambientais, como densidades elevadas, alterações e oscilações de temperatura, radiação ultravioleta, contaminações, presença de agentes infecciosos, entre outros (Liu *et al.*, 2016). Além disso, ocorre quando existe um desequilíbrio entre a atividade dos antioxidantes e as espécies reativas de oxigénio (ROS) (Lushchak, 2011). Em aquacultura a presença de fatores de *stress*, como densidades elevadas e presença de agentes infecciosos, aumentam a formação de ROS, que induzem o *stress* oxidativo (Braun *et al.*, 2010). A superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são exemplos de enzimas antioxidantes (Jia *et al.*, 2013). Estas espécies reativas de oxigénio podem danificar os componentes celulares e as suas funções de auto-oxidação. Como resultado podem ser observadas lesões oxidativas, como perda de componentes antioxidantes (SOD, CAT) (Apel e Hirt 2004; Bopp *et al.*, 2008) e levar à mortalidade e ao desenvolvimento de doença grave (Iwama *et al.*, 2011). A peroxidação lipídica (LPO) é considerado um sinal muito importante de danos oxidativos celulares e é analisado pelo malondialdeído (MDA), um produto da decomposição de hidroperóxidos lipídicos (Draper e Hadley, 1989). Em diversos estudos, foi demonstrado que o excesso de *stress* em produções aquícolas de peixes, induziu a produção de ROS, afetando diretamente ácidos gordos polinsaturados e iniciando a peroxidação lipídica (Sahin *et al.*, 2014; Andrade *et al.*, 2015).

2.5. Transmissão

A entrada do vírus no peixe pode ser através de células epiteliais que cobrem o corpo e/ou barbatanas (Souto *et al.*, 2018c), brânquias (Grotmol *et al.*, 1997), cavidade nasal e oral (Mladineo, 2003). A replicação dos Betanodavírus restringe-se essencialmente ao tecido nervoso, mais propriamente, ao cérebro e retina (Nguyen *et al.*, 1996; Skliris e Richards, 1999; Tanaka *et al.*, 2004). Acredita-se que a disseminação viral seja produzida através do sistema nervoso, por conexões sinápticas (Grotmol *et al.*, 1999; Ikenaga *et al.*, 2002). No entanto, pode ser detetado em amostras de sangue, o que sugere que o vírus utiliza o sangue para se conseguir disseminar para o resto do corpo do peixe. Também já foi observada a presença deste vírus em tecidos não neurológicos, como as brânquias, barbatanas, coração, intestino anterior e posterior, estômago, baço, fígado, rim e gónadas, o que pode estar relacionado com esta propagação através da corrente sanguínea (Totland *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2019). A dinâmica e propagação do vírus pelo corpo do hospedeiro sugere que seja relativamente rápida, como Souto *et al.*, (2018c) verificou no cérebro de *S. senegalensis* um dia após a infeção (1dpi) com o genótipo RGNNV. A replicação rápida deste vírus, implica o rápido desenvolvimento da doença, podendo levar a mortalidade logo após o início do aparecimento dos sinais clínicos. Por exemplo, em infeções intramusculares em *D. labrax*, os primeiros sinais da doença foram registados 4 a 5 dias após a infeção (dpi). Por outro lado, numa infeção por imersão, os primeiros sinais clínicos tendem a surgir 5 a 10 dpi (Péducasse *et al.*, 1999; Vendramin *et al.*, 2014; Toffan *et al.*, 2016).

A transmissão horizontal, de peixe para peixe, ou através da água para o peixe, é comum em *D. labrax*, *S. aurata* e *S. senegalensis*. Esta transmissão, pode ocorrer entre espécies diferentes, como já foi observado em aquaculturas, onde ocorre policultivo de *D. labrax* e *S. aurata* (Castric *et al.*, 2001), e também relatado em ensaios experimentais entre pregado (*Psetta maxima*) e bacalhau do Atlântico (*G. morhua*) (Korsnes *et al.*, 2012). Nesta transmissão pela água, podem estar envolvidas as brânquias e pele, ajudando na disseminação do vírus e consequente transmissão a outros peixes (Souto *et al.*, 2018c). Os principais fatores relacionados com a transmissão horizontal em aquaculturas, são a densidade elevada (regime de cultivo intensivo), e o aumento da temperatura (criando um meio adequado para o desenvolvimento de patógenos virais) (Tanaka, 2004; Souto *et al.*, 2015b).

A transmissão vertical, já foi observada em *H. hippoglossus* (Grotmol *et al.*, 1999), *D. labrax* (Azad *et al.*, 2006), *S. aurata* (Nguyen *et al.*, 1997) e *S. senegalensis* (Nguyen *et al.*, 1997; Souto *et al.*, 2018c). As gónadas estão envolvidas na eliminação do vírus, resultando na contaminação dos ovos. O intestino também participa na eliminação de partículas virais (Nguyen *et al.*, 1997). A transmissão horizontal e vertical, constituem uma enorme preocupação nas aquaculturas, e como tal é necessário que o vírus seja detetado precocemente, através de amostragens de rotina à saúde dos peixes, ou até mesmo de um período de quarentena na receção dos peixes nas instalações aquícolas. Estes, são exemplos de estratégias muito importantes para o controlo de surtos de doenças infecciosas (Gomez *et al.*, 2006; Olveira *et al.*, 2008).

2.6. Patologia

Os surtos de doenças infecciosas no ambiente aquático estão dependentes das interações estabelecidas entre o patógeno e o hospedeiro, e das alterações dos fatores ambientais (Bandín e Souto, 2020). A temperatura, pode interferir na qualidade da água, e sendo os peixes animais poiquilotérmicos também pode ajudar no combate à infeção, ou na modulação da capacidade do agente infeccioso colonizar o peixe. Este tipo de efeito é especialmente evidente em Betanodavírus, pois os genótipos deste vírus possuem diferentes temperaturas ótimas para o seu crescimento. Para o genótipo RGNNV a temperatura ótima é entre 25° e 30 °C (em *D. labrax*) e 28° e 30 °C (em várias espécies de garoupa) (Toffan *et al.*, 2016). Este é o genótipo que se encontra mais amplamente distribuído e, o que possui um maior número de espécies suscetíveis à infeção (Bandín e Souto, 2020) (Figura 2). Esta sensibilidade à temperatura dos Betanodavírus é regulada pelo RNA1 (Hata *et al.*, 2010; Panzarin *et al.*, 2014), especificamente pela região que codifica os aminoácidos 1-445 (Hata *et al.*, 2010).

Os surtos são relatados principalmente em estágios iniciais de desenvolvimento (larvar e juvenil), sendo que a mortalidade significativa também já foi descrita em peixes adultos (Munday *et al.*, 2002). Os sinais clínicos dependem da espécie, estágio biológico, fase de desenvolvimento em que a doença se encontra e temperatura. Comportamento anormal (natação em espiral, rodopio, *looping* horizontal e rápido), exoftalmia, opacidade ocular e perda de apetite, são os sinais mais observados em peixes infetados. Por outro lado, pode observar-se outros sinais como hiperinsuflação da bexiga natatória e anomalias na pigmentação (escuro ou pálido) (Bandín e Souto, 2020).

2.7. Diagnóstico

A detecção de VNN em tecidos não-neurológicos é realizada através de técnicas histológicas ou moleculares. Utilizando estas técnicas a presença de partículas virais foi confirmada na pele, brânquias, barbatanas e intestino de *S. senelagensis* (Souto *et al.*, 2018c), sangue, cérebro, gónadas de *D. labrax* e *S. aurata* (Valero *et al.*, 2015a, Ferreira *et al.*, 2019). Foram desenvolvidos vários métodos de diagnóstico desde o aparecimento desta doença. Primeiro os diagnósticos baseados na observação do comportamento anormal de natação, e depois o diagnóstico através de uma análise histopatológica. Podendo revelar extensa necrose do sistema nervoso central (SNC), com vacuolização e degeneração neural do cérebro, e da retina (Glazebrook *et al.*, 1990; Nguyen *et al.*, 1996; Le Breton *et al.*, 1997). Além destas lesões histológicas em tecidos nervosos, degeneração vacuolar de células epiteliais, foram também relatadas lesões na camada epitelial, opérculo e cavidade oral, observadas em larvas 2 dae (dias após a eclosão) (Nguyen *et al.*, 1996). O tamanho dos peixes é um fator que pode estabelecer diferenças histológicas, pois o tecido neural das larvas afetadas, mostra maior vacuolização em diferentes áreas no cérebro, em comparação com peixes adultos (Mladineo, 2003). No entanto, a histopatologia foi considerada apenas apropriada para um diagnóstico de confirmação através de métodos imunológicos, anticorpo fluorescente indireto (IFAT) ou por coloração com imunoperoxidase (OIE, 2019). O vírus também pode ser identificado por imunohistoquímica (IHQ), sendo que este teste é mais adequado para a detecção do vírus em órgãos que foram fixados para análises histológicas, ou identificado pelo método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), o qual deteta antigénios de Betanodavírus em tecidos-alvo (Arimoto *et al.*, 1992; OIE, 2019). Para o diagnóstico de encefalopatia viral e retinopatia, foi considerado como método de referência o isolamento em linhas celulares, nomeadamente SSN-1 (derivado de *Channo striotus*) e GF-1 (derivado de garoupa, *Epinephelus coioides*) (Chaves-Pozo *et al.*, 2019) e seguido por identificação imunológica ou molecular (Doan *et al.*, 2017). Porém, nos últimos anos, este método foi considerado de baixa sensibilidade, o que leva a falsos negativos, especialmente quando analisados peixes com baixa carga viral. Além disso, para que o isolamento viral seja bem-sucedido é necessário usar-se tecidos cerebrais, o que faz com que seja necessário sacrificar peixes. Como tal, o uso de técnicas moleculares e serológicas começaram a ganhar alguma importância (Doan *et al.*, 2017). Foram relatadas várias técnicas baseadas em transcrição reversa seguida de reação em cadeia de

polimerase (RT-PCR) direcionadas a um ou ambos os segmentos genómicos. Nishizawa *et al.*, 1996, relatou o primeiro protocolo de RT-PCR, baseado na amplificação de um determinado fragmento (430 bp), região T4, capaz de detetar a estirpe SJNNV. Este protocolo também mostrou utilidade para a deteção de outros genótipos de VNN (Nishizawa *et al.*, 1995). O método de RT-PCR, é o método mais rápido para o diagnóstico clínico de peixes infetados, já *quantitative reverse transcription* PCR (RT-qPCR) é uma ferramenta muito importante e útil para diagnosticar peixes subclínicamente infetados, como o caso de portadores (OIE, 2019). Estes métodos baseados em PCR têm muitas vantagens quando aplicados ao diagnóstico de doenças virais, pelo facto de possuírem um reduzido tempo de processamento, rapidez de notificação e alta sensibilidade e especificidade (OIE, 2019). Recentemente, foi desenvolvido um biossensor de fluxo lateral (LFB) o qual é baseado em aptâmero específico que deteta rapidamente e se liga à proteína de revestimento de VNN presente em *E. coioides* (Liu *et al.*, 2020). O LFB tem a capacidade de detetar proteínas de revestimento com reduzidas quantidades de VNN, o que promove uma resposta rápida e sensível. Este método, apesar de ainda só ter sido testado, nesta espécie, aparenta ser uma rápida forma de deteção deste vírus em aquacultura (Yang *et al.*, 2021).

2.8. Quimioterapia, vacinação, imunoestimulação

O uso de produtos químicos, como terapia, para impedir a replicação do vírus, tem sido estudado e sugere que o tropismo de Betanodavírus envolva o sistema neurotransmissor monoamina (Huang e Han, 2014). O uso potencial de ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), foi investigada como um controlo de infeção, e descobriu-se que interage com o genótipo RGNNV, e inibe a infeção viral *in vitro* (Huang *et al.*, 2015). Também o uso de péptidos antimicrobianos (AMPs) foi sugerido como possível método para tratar peixes infetados, devido à capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro. Quando dois AMPs, TH1-5 (tilápia hepcidina 1-5) e Epi-1 (epinedicina-1) foram administrados a peixes, foi demonstrado que TH1-5 teve a capacidade de ajudar a reduzir a carga viral durante a infeção, sendo que o Epi-1 eliminou o vírus durante e após a infeção (Wang *et al.*, 2015). Podem também ser utilizados outros péptidos, que se ligam ao vírus e inibem a infeção viral, através da redução do contacto entre o vírus e a superfície da célula (Zhou *et al.*, 2019; Bandín e Souto, 2020).

Devido às dificuldades em controlar esta doença, têm sido investigadas várias abordagens diferentes para o desenvolvimento de vacinas (Costa e Thompson, 2016; Doan *et al.*, 2017). Atualmente, existem duas vacinas inativadas (com formalina) contra o genótipo RGNNV, a Alpha ject micro®1Noda (Pharmaq) e Icthiovac®VNN (Hipra). Estas vacinas estão disponíveis no mercado para *D. labrax* (Nuñez-Ortiz *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019). A inativação do VNN, é um dos procedimentos mais eficazes, com elevado grau de proteção, não só para *D. labrax*, mas também para outras espécies de peixes, como a *Epinephelus fuscoguttatus* (Pakingking *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2017). Outra estratégia para o desenvolvimento de vacinas, é o uso de vacinas de subunidades (Costa e Thompson, 2016). Os estudos mais recentes, incluem a expressão de proteínas virais em leveduras recombinantes *Saccharomyces cerevisiae* e a incorporação desta na ração, para induzir imunidade protetora contra VNN (Cho *et al.*, 2017). Gonzalez-Silvera *et al.*, (2019), desenvolveram uma vacina recombinante de *Escherichia coli*, a qual pode ser aplicada sem purificação tanto por administração oral como intraperitonealmente. Esta vacina conferiu uma taxa de sobrevivência em juvenis de *D. labrax* de 100%. A vacinação oral pode ser um bom método de larga escala para proteger *D. labrax* de VNN, sem que os peixes tenham de ser expostos a procedimentos dispendiosos e que provoquem *stress*.

O potencial do uso de vacinas de DNA para prevenir surtos de VER foi investigado, em *P. maxima* onde não foi observada proteção (Sommerset *et al.*, 2003), em *Epinephelus marginatus* com proteção entre 43% e 47%, *D. labrax* com 45%, e 77% para *L. calcarifer* (Sommerset *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2015; Valero *et al.*, 2016; Vimal *et al.*, 2016; Bandín e Souto, 2020). Todas estas vacinas foram testadas, essencialmente em larvas e juvenis, visto que estes estágios são muito suscetíveis à doença (Munday *et al.*, 2002; Costa e Thompson, 2016). Em peixes reprodutores, os resultados obtidos indicaram que podem ser uma estratégia útil para impedir a transmissão vertical (Kai *et al.*, 2010). Por outro lado, as vacinas atenuadas ainda precisam de ser mais desenvolvidas para a prevenção de VNN (Boutier *et al.*, 2015; Rouxel *et al.*, 2016).

A maioria dos estudos de vacinas inativadas para VNN, foca-se na utilização de produtos químicos incluindo, a utilização de formalina, *binary ethylenimine* (BEI), propiolactona ou utilização de tratamentos físicos, como o calor e radiação UV (ultra-violeta) (Nuñez-Ortiz *et al.*, 2016; Valero *et al.*, 2018; Bandin e Souto, 2020). A inativação de VNN, é considerado um dos procedimentos mais eficazes e com um elevado grau de proteção para diferentes espécies de peixes, incluindo o *D. labrax*. A inativação

viral com radiação ultravioleta inclui, principalmente UV-C (200-280 nm), o que se tem tornado numa estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas, uma vez que é uma técnica fácil, rápida e acessível (Valero *et al.*, 2018).

Núñez-Ortiz *et al.*, (2016), testaram experimentalmente em peixes infetados com o vírus vivo (RGNNV), a eficácia da imunização com um antigénio formilato (fornecido intraperitonealmente). Os resultados demonstraram uma elevada taxa de proteção (81,9%) para *D. labrax*.

Têm sido desenvolvidos alguns estudos sobre vacinas de microalgas recombinantes em aquacultura, para controlo e prevenção de várias doenças em organismos aquáticos. Numa patente registada pela TransAlgae Inc., Israel (Chen, 2016), selecionaram a proteína do capsídeo de VNN ou fragmento como um antigénio para ser expresso no compartimento subcelular da microalga *Phaeodactylum tricornutum*, e a proteína recombinante foi introduzida no sistema imunológico da mucosa de *Epinephelus aeneus*. Este estudo demonstrou que os antigénios exógenos podem ser usados como estimulantes para a resposta imunológica específica nestes dois peixes, o que sugere que as microalgas transgênicas melhoram a taxa de sobrevivência de peixes juvenis (Ma *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de novos agentes antivirais, funcionam como uma alternativa segura e eficaz à utilização de medicamentos químicos nas aquaculturas. Nalguns estudos realizados verificou-se que alguns polissacarídeos isolados de diversas fontes, possuem atividades antivirais e imunomoduladoras, que são adequados para o desenvolvimento de reagentes antivirais (Ivanova *et al.*, 1994). Os aditivos adicionados em rações de aquacultura são feitos à base de ingredientes não nutritivos, que após incluídos em formulações específicas contribuem para melhorar a saúde dos peixes e fortalecer o sistema imunitário, protegendo os animais contra agentes infecciosos (Harikrishnan *et al.*, 2011). A administração de extrato de *Chlorella vulgaris* em dietas de *Cromileptes altivelis* infetados com VNN, promoveu o aumento do número de eritrócitos e diminuição do número de células basófilas e neutrófilas, o que se resume a um aumento do sistema imunológico dos peixes infetados. De todos os estudos com esta microalga, o mais adequado foi o que continha 33 µg/mL de extrato de *C. vulgaris* (Junirahma e Yanuhar, 2020). As algas castanhas (*Phaeophycophyta*) são conhecidas por produzir diferentes polissacarídeos, como alginatos e fucoides (Percival e McDowell, 1967; Painter, 1983). Os fucoides têm inúmeras atividades biológicas como anticoagulante (Nishino *et al.*, 1991), anti-trombótico (Mauray *et al.*, 1995), anti-inflamatório (Blondin *et al.*, 1994),

anti-tumoral (Zhuang *et al.*, 1995) e antiviral (Venkateswaran *et al.*, 1989). *Adenocystes utricularis* é uma alga castanha, da qual se podem extrair de polissacarídeos com atividade antiviral (Ponce *et al.*, 2003). Também algumas algas verdes (*Chlorophyta*), como por exemplo *Caulerpa racemosa*, constituem uma importante e abundante fonte de polissacarídeos ativos, devido ao seu ambiente de crescimento específico, possuindo um alto potencial antivírico, anti-tumoral, anti-inflamatório e anticoagulante (Wijesekaraa *et al.*, 2011). Os polissacarídeos sulfatados de *Ulva pertusa*, aumentaram a atividade imune, na presença do vírus da gripe aviária (Song *et al.*, 2016). De diversas algas vermelhas (*Rhodophyta*), como *Gigartina skottsbergii*, é possível sintetizar grandes quantidades de carragenanas, que são polissacarídeos sulfatados (SPs). Estes polissacarídeos apresentam atividade antiviral, contra vários tipos de vírus, nomeadamente o vírus herpes em bovinos (BoHV-1) e suíno (SuHV-1) (Pujol *et al.*, 2006). Muitos extratos de plantas demonstraram um efeito inibitório contra diversos vírus. Extratos de *Boerhaavia difusa*, *Mirabilis jalapa*, *Clerodendrum aculeatum*, *Potentilla arguta*, *Sambucus racemosa*, *Thuja orientalis*, são alguns exemplos de plantas com atividade antiviral, devido à sua capacidade de induzir resistência sistêmica e inibir a replicação viral (Jassim e Naji, 2003; Elbeshehy *et al.*, 2015; Waziri, 2015). Geralmente, extratos de plantas são uma forma eficaz e ecológica contra uma ampla gama de patógenos (Osbourn e Lanzotti, 2009).

O extrato de chá verde, também possui uma forte atividade antiviral, por exemplo contra a hepatite A. Este extrato é rico em polifenóis obtidos a partir da planta *Camellia sinensis* L. (Seeram *et al.*, 2006). As espécies de eucalipto são conhecidas por serem uma fonte rica em compostos ativos, incluindo compostos fenólicos, flavonoides, terpenoides, taninos, floroglucinol e glicosídeos cardíacos. Estes compostos têm um potencial de atividade antimicrobiana (Babayi *et al.*, 2004; Lawal *et al.*, 2012; Bouharb *et al.*, 2014; Elansary *et al.*, 2017). De acordo com Orhan *et al.*, (2009), extratos de hexano extraído de várias plantas como *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber *ssp. chia* (Schreber), possuem atividade antiviral contra o vírus *Herpes simplex* (HSV) e *Paragripe viruses* (PIV) (Özcelik *et al.*, 2005a). As plantas medicinais são conhecidas por ter efeitos de proteção contra uma ampla gama de bactérias, protozoários, parasitas e vírus (Kudi e Myint, 1999; Pringproa *et al.*, 2014). Vários estudos demonstraram que a utilização de extratos de plantas medicinais, têm efeito protetor contra os diversos subtipos de vírus gripe aviária H1N1, H5N1 e H3N8, que são os responsáveis por uma das doenças infecciosas virais zoonóticas (Ng e To, 2007). Algumas das plantas medicinais usadas para estudar os

efeitos antivirais contra a infecção do vírus H5N1 são a *Andrographis paniculata*, *Curcuma longa*, *Gynostemma pentaphyllum*, *Kaempferia parviflora* e *Psidium guajava*. Estas plantas também demonstraram atividade antiviral contra o vírus herpes Simplex, tipo 1 (Wuart *et al.*, 2005), vírus da doença de Newcastle (Yu *et al.*, 2013), vírus de hepatite B (Kim *et al.*, 2009), vírus de gripe H1N1 (Khazeni *et al.*, 2009), vírus da imunodeficiência humana (HIV) e citomegalovírus humano (Sookkongwaree *et al.*, 2006). As plantas mencionadas anteriormente, apresentam a capacidade de induzir a expressão de mRNA (Oldstone e Rosen, 2014; Liu *et al.*, 2016) das células infectadas (Sood *et al.*, 2012; Klaywong *et al.*, 2014). Seo *et al.*, (2012) demonstrou que o probiótico, *Leuconostic mesenteroides*, apresenta eficácia antiviral contra o vírus da gripe aviária H9N2. *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus acidophilus*, quando combinados ou individualmente, podem exercer efeitos superiores na inibição da replicação do vírus da gripe A em macrófagos de frangos. A estimulação de macrófagos através da inclusão de probióticos nas dietas aumentam a atividade antiviral contra diversos vírus, nomeadamente o vírus da gripe, vírus herpes Simplex e vírus da estomatite vesicular incidente em ratos e porcos (Dugas *et al.*, 1999; Ellermann-Eriksen, 2005).

3. Objetivo

O presente estudo tem como objetivos avaliar o efeito da suplementação da dieta de *D. labrax*, com diferentes doses de 3 extratos, através da avaliação da performance de crescimento, parâmetros hematológicos, imunológicos e de *stress* oxidativo. Também foi estudado o efeito dos extratos na sobrevivência de *D. labrax* quando expostos a uma infecção com Betanodavírus (genótipo, RGNNV).

Página deixada intencionalmente em branco

II. Metodologia

1. Ensaio de alimentação com dieta suplementada com os extratos

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes sobre a proteção de animais usados para fins científicos da Diretiva Europeia 2010/63/EU, sob a supervisão de um perito acreditado em Ciências de Animais de Laboratório pela Direção Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV).

Foram utilizados 288 juvenis de *D. labrax*, provenientes do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), mais propriamente da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), com peso médio inicial de $5,30 \pm 1,23$ g. O ensaio foi desenvolvido no edifício Cetemares (Politécnico de Leiria, Peniche). Aquando da sua chegada, os peixes foram mantidos em quarentena até ao início do ensaio. Antes de se iniciar esta parte do estudo, os peixes foram individualmente anestesiados com 0,5 mL/L de 2-fenoxietanol (VWR Chemicals, Portugal) e pesados com a utilização de uma balança analítica (Sartorius, Alemanha).

Foram distribuídos 14 peixes por cada aquário de 60 L, em triplicado por cada tratamento, com uma densidade de $1,41 \text{ kg/m}^3$. Antes de se iniciar o ensaio do período de alimentação (52 dias), os juvenis foram aclimatados, durante sete dias, período em que se e monitorizaram os seguintes parâmetros da qualidade da água: temperatura ($20,8 \pm 0,4$ °C), pH ($8,2 \pm 0,0$), salinidade ($32,3 \pm 0,5$), oxigénio dissolvido ($6,7 \pm 0,2$ mg/L) com um nível de saturação médio de 91,3 %. Para a medição da temperatura, pH, salinidade e oxigénio dissolvido na água, foi utilizada uma sonda multiparamétrica *Professional Plus* (YSI, EUA) e para medição da salinidade foi usado o refratómetro *Seawater refractometer H196822* (Hanna Instruments, Portugal). Após o período de aclimação, iniciou-se o ensaio de alimentação com dietas suplementadas com os extratos, e foram monitorizados diariamente os seguintes parâmetros da qualidade da água: temperatura ($20,8 \pm 1,2$ °C), pH ($8,2 \pm 0,1$), salinidade ($32,1 \pm 0,3$), oxigénio dissolvido ($6,6 \pm 0,2$ mg/L) com um nível de saturação médio de 89,2 %. Durante este período foi observada e registada a mortalidade.

Cada tratamento era composto por três aquários ligados a um sistema RAS (filtro mecânico e biológico) (Figura 4). Para garantir a qualidade da água, os aquários foram sifonados diariamente (após a alimentação), para retirar restos alimento não consumido e

fezes. A ração experimental foi preparada em dois *batch*, para garantir e manter a qualidade das dietas ao longo do ensaio. A quantidade de ração, foi calculada previamente de acordo com a percentagem da ração consumida por dia, tendo em conta a biomassa e a temperatura da água. Os extratos foram dissolvidos em 30 mL de álcool a 80 %, aplicaram-se na ração e em seguida misturou-se bem para garantir a homogeneidade e deixou-se secar ao ar à temperatura ambiente. Aplicou-se um *coating* de 30 mL de óleo de peixe, deixou-se secar e depois foram armazenadas no frigorífico até serem fornecidas aos peixes.

Os peixes foram alimentados duas vezes por dia (9:00 h e 14:00 h), até à saciedade, não excedendo o limite percentual indicado na tabela de alimentação face à biomassa, peso médio dos peixes e temperatura da água. Inicialmente 4% peso/dia, o qual foi ajustado durante o ensaio da alimentação, tendo em conta a quantidade de alimento ingerido e observando o comportamento dos peixes na hora da alimentação.

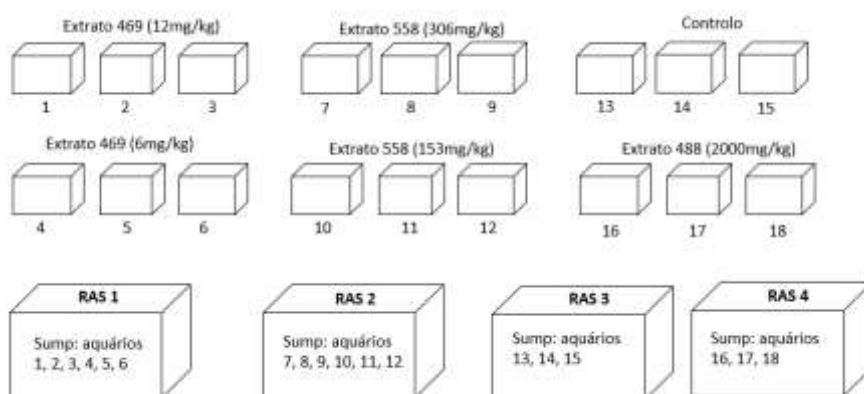


Figura 4: Representação esquemática do desenho experimental dos aquários durante o ensaio de alimentação.

Após o período de alimentação foram amostrados dois peixes por aquário ($n = 6$) para cada tratamento. Cada peixe foi anestesiado individualmente com 0,5 mL/L de 2-fenoxietanol (VWR Chemicals, Portugal) para se realizar a pesagem e recolha de sangue. O sangue foi recolhido com seringas estéreis de 1 mL NORM-JECT (VWR Chemicals, Portugal), e agulhas hipodérmicas (25G x 5/8" 0,5mm x 16 mm (Konvex, Lleida, Espanha) heparinizadas (3000 unidades/mL) (BRAUN, Portugal) da veia caudal. Em seguida, fez-se um esfregaço para contagem de células sanguíneas e o restante foi centrifugado a 10 000 g, durante 10 minutos numa centrífuga (Centrifuge 5804,

Eppendorf, Alemanha) refrigerada a 4°C para se obter o plasma para parâmetros de resposta imune. Após a centrifugação transferiu-se imediatamente o sobrenadante para microtubos estéreis. Depois os peixes, foram eutanasiados individualmente com sobredosagem de anestésico (1 mL/L). Retirou-se em seguida fígado, o qual foi colocado em microtubos e imediatamente colocados em azoto líquido. Foi também recolhido rim cranial, e colocado em microtubos de *RNase* e *DNase-free* com 200 µL *RNAlater* (Sigma Aldrich, EUA) a 4°C durante 24 horas, sendo posteriormente removido. Todas as amostras, foram depois armazenadas a -80°C até à sua utilização.

2. Infecção por imersão

Após o período de alimentação com dietas suplementadas com os extratos, parte dos peixes (T = 252) foram transferidos para a Sala de Contenção, onde foram colocados em 12 baldes de 30L com água salgada, com uma temperatura de 24 ± 1 °C e arejamento para se proceder à infecção. Destes, 6 seriam de peixes que não seriam infetados (tratamento controlo) e outros 6 com peixes a serem infetados. A infecção foi por imersão, com concentração de $TCID_{50}$ (*Median Tissue Culture Infectious Dose*) = 10^6 /mL do genótipo RGNNV. Os peixes não infetados foram sujeitos ao mesmo procedimento, mas com uma solução salina de fosfato, PBS (tampão fosfato-salino) (Sigma Aldrich, EUA). Após 60 minutos da infecção, os peixes foram distribuídos por 12 aquários de 60 L cada, divididos em 3, com um volume de 20 L por divisória (Figura 5), sendo a distribuição dos aquários pelas estantes aleatória. Em cada divisória ficaram 7 peixes, com peso final médio de $17,82 \pm 0,73$ g (pesagem realizada após o ensaio de alimentação com dietas suplementadas com os extratos), com uma densidade de 7 kg/m^3 . Destes 12 aquários, 6 continham peixes não infetados de cada tratamento, e os outros 6 aquários peixes infetados de cada tratamento com extrato.

Durante o ensaio foram monitorizados, diariamente, os seguintes parâmetros da qualidade da água: temperatura ($24,3 \pm 1,4$ °C), salinidade ($32,9 \pm 0,4$), oxigénio dissolvido ($6,6 \pm 0,3 \text{ mg/L}^1$), com um nível de saturação médio de 94,9 %. Para a temperatura, pH, salinidade e oxigénio dissolvido foi utilizada uma sonda multiparamétrica *Professional Plus* (YSI, EUA) e para salinidade foi usado o refratómetro *Seawater refractometer*, H196822 (Hanna Instruments, Portugal).

O ensaio da infecção durou 21 dias, e durante esse tempo os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 h e 14:00 h), com as dietas dos diferentes tratamentos. Após ser

fornecida a alimentação, à primeira hora do dia, realizava-se uma pequena sifonagem apenas para retirar, de cada uma das divisórias, restos de alimento não consumido ou fezes. A mortalidade dos peixes foi registada diariamente. Foi observado e registado o comportamento dos animais e sinais clínicos da doença, (Em anexo, tabela III). Os peixes com sinais da doença foram eutanasiados através de sobredosagem de anestésico (1 mL/L), e retirado o cérebro para quantificação de vírus e análise histológica.

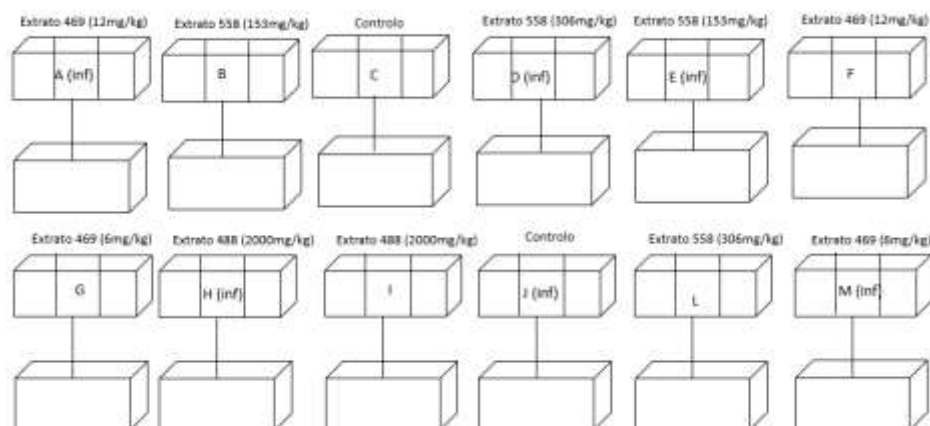


Figura 5: representação esquemática do desenho experimental dos aquários durante o ensaio de infeção.

Ao 7º dia após a infeção, foi amostrado um peixe por divisória, ou seja, três peixes por aquário/tratamento ($n = 3$), os quais foram anestesiados como anteriormente mencionado, recolhido sangue para obtenção de plasma para análise de resposta imune, e depois sacrificados (com sobredose de anestésico) para obtenção do cérebro para quantificação de vírus e análise histológica. As amostras de cérebro foram colocadas em microtudos de *RNase e DNase-free* com 1000 μL *RNAlater*, durante 24 horas a 4 °C. Após este período foi retirado o *RNAlater*. As amostras foram conservadas a -80 °C até à sua utilização. As amostras de cérebro retiradas para análise histológica foram colocadas em tubos e submersos em formol tamponado a 10% (VWR Chemicals, Portugal) durante 24 horas, sendo depois retirado o formol e substituído por etanol a 70% (Aga, Portugal) até à sua utilização.

3. Performance de crescimento

Para o cálculo da performance de crescimento todos os peixes foram pesados quando se iniciou o período de alimentação (peso inicial, W_i), e após os 52 dias (peso final, W_f). Durante o ensaio do período de alimentação, foi contabilizado o valor total do alimento ingerido por aquário.

- 1) Peso ganho (WG) %, calculado como:

$$WG = \frac{(W_f - W_i) * 100}{W_i}$$

Sendo que o W_f é o peso médio final e o W_i o peso médio inicial.

- 2) Peso corporal médio (ABW) (g), calculado como:

$$ABW = \frac{W_f + W_i}{2}$$

- 3) Ingestão voluntária de alimento (VFI) (% peso corporal/dia), calculado como:

$$VFI = \frac{\left(\frac{\text{Valor médio de alimento ingerido (g)}}{ABW (g)}\right)}{t} * 100$$

O t é o tempo, em dias, da duração do ensaio do período de alimentação (52 dias).

- 4) Índice de crescimento diário (DGI) (%/peso corporal dia), calculado como:

$$DGI = \frac{W_f^{1/3} - W_i^{1/3}}{t} * 100$$

- 5) Taxa de conversão alimentar (FCR), calculado como:

$$FCR = \frac{\text{Valor médio do alimento ingerido (g)}}{WG (g)}$$

4. Análise Hematológica

Dois peixes por aquário (n = 6) foram retirados para a amostragem após o ensaio de alimentação. Um a um, os peixes foram anestesiados com 0,5 mL de fenoxietanol (VWR Chemicals, Portugal) e, foi retirado sangue com seringas heparinizadas (3000 unidades/mL) (BRAUN, Portugal) da veia caudal. O sangue retirado de cada um dos peixes foi colocado num microtubo de 1,5 mL, mantidos sobre o gelo, e foi utilizado para as seguintes determinações: hematócrito, quantificação de hemoglobina, contagem de eritrócitos e leucócitos, contagem diferencial de células sanguíneas. Foram calculados índices hemáticos, o volume corpuscular médio (MCV), a hemoglobina corpuscular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC). O valor do hematócrito foi calculado enchendo com sangue tubos microhemáticos (Brand, Alemanha), seguindo-se centrifugação (Hematokrit 200, Hettich, Alemanha) a 10 000 rpm, durante 10 minutos. O valor do hematócrito foi lido através da colocação do leitor de gráfico sobre o rotor.

Para a contagem diferencial de células, colocou-se uma gota de sangue (cerca de 5 μ L) sobre uma lâmina, fez-se um esfregaço, deixou-se secar ao ar e depois de fixada com formaldeído-etanol (VWR Chemicals, Portugal) (10% de 37% formaldeído em etanol 96%), foi utilizado o corante de Wright's (Haemacolor, Alemanha) (Kaplow e Ladd, 1965). Numa contagem de 200 leucócitos, foram classificados como trombócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos, por observação das lâminas com os esfregaços ao microscópio ótico sob óleo de imersão, com uma ampliação de 1000x. Para a contagem diferencial de células, nomeadamente os neutrófilos foram identificados, através de deteção de peroxidase segundo Afonso *et al.*, (1998). Os resultados são apresentados em valor absoluto ($\times 10^4/\mu$ L) de cada tipo celular.

A hemoglobina foi quantificada utilizando o método colorímetro de Drabkin (Spinreact, Espanha). Em cada microtubo de 1,5mL foram 500 μ L de reagente de Drabkin (diluído duas vezes), juntamente com 2 μ L de sangue de cada uma das amostras (as quais foram protegidas da luz). Posteriormente colocou-se 100 μ L de cada microtubo em cada poço da microplaca (triplicados por cada amostra), para a leitura da absorvância a 540 nm no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA).

Para avaliar a concentração total de eritrócitos e leucócitos no sangue foram realizadas diluições de 1:20 (895,5 μ L HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) (Sigma Aldrich,

EUA) com 30 unidades de heparina/mL (BRAUN, Portugal) e 4,5 µL de sangue de cada uma das amostras) e 1:200 (95 µL HBSS com 30 unidades de heparina/mL e 5 µL de sangue de cada uma das amostras), respetivamente. Foram colocados 10 µL de cada uma das amostras na câmara de Neubauer (Sigma Aldrich, EUA) e realizada a contagem das células sanguíneas dos quatro quadrantes laterais e de uma central da câmara, através da utilização de um Microscópio Binocular (AXIO, Zeiss, Alemanha). Os resultados são apresentados em contagem de células $\times 10^4/\mu\text{L}$ para os leucócitos e $\times 10^6/\mu\text{L}$ para eritrócitos. De acordo com Machado *et al.*, (2015), foi calculado o MCV, MCH e MCHC, após a obtenção dos valores de hematócrito, hemoglobina e contagem total de leucócitos.

5. Parâmetros plasmáticos

5.1. Glucose

A glucose plasmática foi determinada usando o *kit* de referência 201001190 (Spinreact, Espanha) tendo em conta a reação da glucose oxidase (GOD) e peroxidase (POD). Foram utilizados 10 µl do plasma de cada uma das amostras ($n = 6$), e adicionado 1 µl da mistura dos reagentes (R1 Tampão e R2 Enzimas). Após a mistura ter sido feita, foi incubada a 37 °C na estufa (Mettler, Alemanha) durante 10 minutos. Utilizou-se cuvetes de 1 cm, ajustou-se o espectrofotómetro (UV-Visible Spectrophotometer Evolution 201, ThermoFisher Scientific, EUA), colocou-se a mistura de cada uma das amostras em cada cuvete, e procedeu-se à leitura com um comprimento de onda de 505 nm. Todas as medições foram feitas em triplicados. Os valores da glucose para cada uma das amostras foram calculados e expressos em mg/dl de glucose na amostra.

5.2. Parâmetros de resposta imune

5.2.1. Concentração da Lisozima

Para a determinação da concentração da lisozima plasmática, foi usado um ensaio turbidimétrico de acordo com Costas *et al.*, (2011). Foi preparada uma solução de tampão hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4 0,05 M, pH = 6,2) (Appllichem, Espanha) e uma suspensão bacteriana de *Micrococcus lysodeikticus* 0,5 mg/mL (Sigma Aldrich, EUA). Numa microplaca, foram adicionados 15 µL de cada amostra (com triplicados) e 250 µL da suspensão bacteriana. Esta reação ocorreu a 25 °C, com uma absorvância medida de 450 nm, aos 0 e 10 minutos, no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA). A curva padrão utilizada foi preparada usando liofilizado de lisozima de clara de ovo de galinha (Sigma Aldrich, EUA), a qual foi diluída em série, com o tampão

anteriormente preparado (0,05 M, pH = 6,2) (Costas *et al.*, 2011). Os valores da lisozima em cada uma das amostras, foram calculados usando a fórmula da curva padrão, e expresso em µg/mL.

5.2.2. Atividade da Peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada através do método de Quade e Rothe (1997). Em termos de procedimento, foram diluídos 2 µL de plasma de cada uma das amostras em 148 µL de HBSS, sem Ca²⁺ e Mg²⁺ (Merck, Alemanha) numa placa com 96 poços. Três poços da placa, sem plasma, foram utilizados como brancos. Em seguida, foram adicionados 50 µL da solução 3'3, 5'5 – *tetramethylbenzidine hydrochloride* (TMB, 10mM) (Sigma Aldrich, EUA) a cada um dos poços, e depois adicionados também 50 µL da solução de peróxido de hidrogénio (H₂O₂, 5mM) (Sigma Aldrich, EUA) em cada poço. Após esta última adição, contabilizou-se 2 minutos, e a reação da mudança de cor é interrompida através da adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 2M). Logo de seguida, mediu-se a absorvância a 450 nm no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA). Todas as leituras foram feitas em triplicados. A atividade da peroxidase (unidades/mL de plasma) é determinada de acordo com o pressuposto de que uma unidade de peroxidase origina uma mudança de absorvância de 1 unidade na densidade ótica (OD).

6. Biomarcadores de *stress* oxidativo

Os parâmetros do *stress* oxidativo foram medidos no fígado homogeneizado extraído de cada um dos peixes na amostragem do ensaio de alimentação. As amostras de fígado pesadas (0,1g) colocadas em microtubos de 2 mL, onde foi adicionado 1000 µL de água ultrapura. Em seguida as amostras foram mantidas em gelo, e usado o homogeneizador *Disposable Pellet Mixer* (VWR Chemicals, Portugal) durante cerca de 30 segundos. Deste homogeneizado, foi retirado uma alíquota de 200 µL para microtubos de 2 mL, para posterior avaliação de LPO, já com 4 µL de BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) 4% em metanol (Sigma Aldrich, EUA), e foi ao vortex. As amostras foram colocadas a – 80 °C, até à determinação da peroxidação lipídica (LPO). Do homogeneizado inicial, foi também retirado 800 µL de cada amostra de tecido e colocado em microtubos de 2 mL, para ser utilizado para avaliação da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Em cada um destes microtubos de 2 mL foi também adicionado, além do tecido da amostra,

700 μL de tampão fosfato-potássio (adição da solução básica K_2HPO_4 com solução ácida KH_2PO_4 0,2M, $\text{pH} = 7,4$) (Sigma Aldrich, EUA). Cada um dos tubos depois de misturado o conteúdo no vortex, foi colocado na centrífuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Alemanha) a 10 000 x g, durante 20 minutos, a 4 $^\circ\text{C}$. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e feitas alíquotas, as quais foram mantidas a – 80 $^\circ\text{C}$, até à sua utilização.

6.1. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo Almeida *et al.*, (2010), através da utilização do método do citocromo C, xantina/xantina oxidase, como fonte de radicais de superóxido. Foi preparada uma reta padrão, a partir de uma solução padrão de SOD (300 U/mL de proteína), com diversas concentrações, 0, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125, 0,05, 0,025 U SOD (Sigma Aldrich, EUA). Em seguida, as amostras foram diluídas para 0,3 mg/mL de proteína, depois foi colocado 50 μL de cada amostra diluída (em triplicado) juntamente com 200 μL de solução de reação contendo tampão fosfato-potássio 50mM com 1mM de Na-EDTA ($\text{pH} = 7,8$) (preparado através da adição de Na_2HPO_4) (Applichem, Alemanha), NaH_2PO_4 (Applichem, Alemanha) e Na-EDTA (Applichem, Alemanha), xantina 0,7mM (Sigma Aldrich, EUA), Citocromo C 0,03mM (Sigma Aldrich, EUA). Imediatamente após a adição da solução de reação, rapidamente foram pipetados 50 μL de solução de xantina oxidase 0,03 U/mL (Sigma Aldrich, EUA) para cada um dos poços. A absorvância foi lida no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA) a 550 nm, com leituras de 20 em 20 segundos até perfazer um total de 3 minutos. A atividade da SOD foi expressam em U/mg de proteína, sendo que uma unidade de atividade representa a quantidade de enzima necessária para que seja produzida uma inibição de 50% da taxa de redução do citocromo C.

6.2. Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase, foi avaliada de acordo com Clairborne (1985), e medida após o consumo do substrato de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Foi utilizada uma microplaca apropriada para uma leitura com luz ultravioleta. Adicionou-se 10 μL de cada uma das amostras diluídas para 0,7 mg/mL de proteína (em triplicado), juntamente com 140 μL de tampão fosfato-potássio (0,05M, $\text{pH}=7,0$) (preparado pela adição da solução básica K_2HPO_4 e solução ácida KH_2PO_4) (Applichem, Alemanha) e 150 μL da solução de peróxido de hidrogénio (H_2O_2 , 30%) (Sigma Aldrich, EUA). Foi lida a absorvância,

no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA) a 240 nm durante 2 minutos (uma leitura a cada 15 segundos de intervalo). A atividade da enzima catalase foi expressa em U/mg de proteína, sendo que foi usado o coeficiente de extinção molar (ϵ) de H₂O₂ de 40 M/cm.

6.3. Peroxidação lipídica (LPO)

A determinação do LPO, foi de acordo com Bird e Draper (1984). Este método é baseado na reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) num pH ácido de 90-100 °C. Na reação de teste de TBA, o malondialdeído (MDA) ou substância semelhantes a MDA (produzidas durante a peroxidação) e o TBA reagem com a produção de um pigmento cor-de-rosa, com absorção máxima de 535 nm. Foi colocado em cada microtubo de 2 mL, 200 μ L de cada amostra de tecido homogeneizado (n = 6), 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA) (C₂HCl₃O₂) (Sigma Aldrich, EUA) frio a 100%, juntamente com 1 mL da mistura de reagentes de TBA 0,73% (ácido *2-Thiobarbituric acid* C₄H₄N₂O₂S) (Sigma Aldrich, EUA), Tris-HCl (*Trizma hydrochloride* NH₂C(CH₂OH)₃ · HCl) (Sigma Aldrich, EUA) e DTPA (*Diethylenetriaminepentacetic acid* [(HOOCCH₂)₂NCH₂CH₂]₂NCH₂COOH) (Sigma Aldrich, EUA) mantidos frescos. As amostras foram incubadas a 60 °C, durante 60 minutos na estufa, e em seguida centrifugadas (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Alemanha) a 11 500 rpm, durante 5 minutos. Do sobrenadante, foram retirados 200 μ L de cada amostra, e transferidos para cada um dos poços da microplaca, em triplicados. Em seguida, foi realizada a leitura no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA) a 535 nm. Os valores de LPO foram calculados e expressos em TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) (nmol/g), usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) de 1,56 x 10⁵ (M/cm) de MDA.

7. Análise Histológica do cérebro

Para a análise histológica do cérebro fez-se uma amostragem ao 7º dia após o ensaio de infecção (n = 3). As amostras foram colocadas em formol tamponado a 10% (Bio-Optica, Milano, Itália) durante 24 horas. Após este período, foi retirado o formol e substituído por etanol a 70% (VWR Chemicals, Portugal) até ao processamento. As amostras de cérebro, foram colocadas num processador automático de tecidos (Leica-TP 1020, Alemanha), foram preparadas para a inclusão em parafina, para posterior microtomia. Os cortes foram realizados com o micrótomo (Sakura ® Accu-Cut ® SRM™

200, Sakura, Holanda) com a espessura de 5-7 μm , e colocados a secar numa estufa (Binder, Alemanha) a 37 °C durante pelo menos 24 horas. A coloração foi realizada com a técnica da Hematoxilina-eosina (H&E) (VWR Chemicals, Portugal). Este método de coloração inclui seis etapas, a desparafinação que permite eliminar a parafina dos cortes, a hidratação através da decrescente concentração de etanol (100, 96, 70 e 50%), e por fim a etapa da montagem, com a utilização do meio de montagem DPX (*Distrene Plasticiser Xylene*) (VWR Chemicals, Portugal) onde se obtém a preparação definitiva (Lopes e Malhão, 2016). Estas lâminas foram colocadas a secar à temperatura ambiente durante cerca de 48-72 horas, e depois observadas ao microscópio com câmara fotográfica (Leica DM 2000 LED + Leica MC 170 HD, Alemanha), com o objetivo de observar as diversas alterações ocorridas no cérebro dos peixes.

8. Expressão de genes

A extração de RNA de rim cranial foi realizada utilizando o kit NZY Total RNA Isolation (NZYTech, Portugal), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Para a ruptura e lise das células foi utilizado 500 μL do reagente NZYol (NZYTech, Portugal), e as amostras foram homogeneizadas no Precellys (Bertin Technologies, França) durante dois ciclos de 20 segundos cada a 6000 rpm. Quando terminada a homogeneização foi adicionado 150 μL de clorofórmio para ocorrer separação de ácidos nucleicos com o restante material. Após o processo de extração, as amostras de RNA foram quantificadas, e conseqüentemente avaliada a sua pureza através de espectrofotometria com o NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, EUA). A pureza do RNA foi avaliada pelos rácios 260/280nm e 260/230nm. Foi também verificada a qualidade do RNA através de eletroforese em gel de agarose 2% (Lonza, Suíça), adicionando 1 μL GreenSafe Premium (NZYTech, Portugal), e 500 μL de lixívia comercial (Aranda *et al.*, 2012). Depois dos poços carregados com as amostras, ligou-se à corrente a 100V durante 50 minutos no Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, EUA). Após este período, retirou-se o gel e observou-se a integridade de RNA no ChemiDocTM MP, Imaging System (Bio-Rad, EUA).

Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (NZYTech, Portugal) seguindo as instruções do fornecedor. Esta etapa permitiu padronizar todas as amostras (28,74 ng/ μL) para um volume final de 40 μL (adicionado

a um tubo de 200 µL) e a transcrição de RNA em cDNA, de acordo com as condições na Tabela I. A transcriptase reversa (RT-PCR) foi realizada no T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, EUA).

Tabela I: Condições utilizadas para a síntese de cDNA, temperatura (°C) e tempo (minutos).

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Temperatura constante da tampa do Termociclador: 105 °C
25	10	
50	30	
85	5	
4	Tempo infinito	
37	20	

O PCR quantitativo em tempo-real foi realizado em triplicado no CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad, EUA) para testar a eficiência cada um dos *primers* escolhidos (Em anexo, tabela I) através de uma *pool* de todas amostras (2 µL de cada), fez-se sucessivas diluições (0, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) preparadas através da adição de 3,4 µL de *RNase-free water* (NZYTech, Portugal), 0,3 µL de *Reverse* (Stabvida, Portugal), 0,3 µL de *Forward* (Stabvida, Portugal), 5 µL de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, EUA) e 1 µL de cDNA. A escolha de cada *primer* para testagem da sua eficiência teve por base a função de cada um exerce no sistema imunitário de *D. labrax*. A eficiência foi selecionada para valores de 90 a 120%, ou com declives aceitáveis de -2,7 e -4, e idealmente entre -3,2 e 3,7. Como tal, foram selecionados os genes de acordo com a sua categoria funcional para a próxima etapa de testagem de cada uma das amostras: Gene de *stress* (*hsp-90*), Imunidade inata (*il-6*, *il-8*, *il-10*, *il1-β*, *irf3*, *irf7*, *traf3*, *pkr*, *ifn*, *tlr9*), e Imunidade adaptativa (*Ighm* e *Ight*). O gene *actb* foi usado como gene de referência para uniformização de todas as amostras (Em anexo, tabela I). Nesta etapa de testagem, bem como para a eficiência foi usada iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, EUA), e as condições para o *real-time* foram idênticas entre os diferentes genes usados, variando tempo (tendo em conta os pares de base de cada um) e na respetiva temperatura de *annealing*. Estas condições consistiram em dois passos (A e B):

A) 3 minutos a 95 °C para a desnaturação inicial;

B) 40 ciclos de duas etapas:

1. 30 segundos a 95 °C para a desnaturação;

2. x segundos com a temperatura de *annealing* de cada *primer* diferente para cada gene (temperatura ótima que os nucleótidos se ligam à cadeia);
3. 72 °C para a extensão

As amostras foram normalizadas utilizando o gene de referência *actb* (β -actin), para cada gene alvo com uma eficiência aceitável, utilizando o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001) para os cálculos da expressão de genes.

9. Quantificação de vírus

Para a extração de RNA de cérebro e RNA viral foi utilizado inicialmente o reagente NZYol (NZTech, Lisboa, Portugal), em seguida adicionou-se o clorofórmio, como mencionado anteriormente para a expressão de genes. Após a homogeneização das amostras, foi retirada a fase aquosa transparente a qual foi completamente misturada com etanol a 70%. A partir desta etapa, foram utilizadas as colunas azuis para purificação de RNA e o kit NucleoSpin RNA Mini (Macherey-Nagel, Dueren, Alemanha), de acordo com as instruções do fornecedor. Quando extraído o RNA foi avaliada a sua concentração em cada uma das amostras com o espectrofotômetro NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA). A qualidade do RNA foi averiguada através de eletroforese em gel de agarose 2%, com a adição de 1 μ L GreenSafe Premium (NZYTech, Lisboa, Portugal), e 500 μ L de lixívia comercial (Aranda *et al.*, 2012). Em seguida, os poços foram carregados com as amostras, ligou-se à corrente a 100V durante 50 minutos no Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Seguidamente, o gel foi retirado e observou-se a integridade de RNA no ChemiDocTM MP, Imaging System (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

A seguir à extração de RNA, utilizou-se 5 μ L de cada amostra de RNA, e com o kit SuperScript One Step RT-PCR System with PlatinumTM Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi realizada a síntese de cDNA. Este cDNA foi apenas utilizado para detecção da presença do vírus no tecido cerebral, em gel de agarose. Foi preparada uma solução com um volume final de 50 μ L, no qual foi adicionado 17 μ L de RNase-free water, 25 μ L de 2x Reaction Mix, 1 μ L de sense primer (F2) e anti-sense primer (R3) (Nishizawa *et al.*, 1994) (Stabvida, Caparica, Portugal) ambos com uma concentração final de 10 μ M, 1 μ L da enzima RT/PlatinumTM Taq Mix. Depois de misturados estes componentes da reação em cada microtubo de centrífuga, foi adicionado 5 μ L de cada uma das amostras de RNA, como mencionado anteriormente, incluindo o

RNA viral, e em seguida realizado um mini-spin (Sprout™, Heathrow Scientific, Nottingham, Inglaterra). Os microtubos de centrífuga foram colocados no T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Califórnia, EUA), de acordo com as condições de RT-PCR presentes na Tabela II Após a síntese de cDNA de todas as amostras, foram realizados vários géis de eletroforese com agarose 2% (Lonza, Basileia, Suíça), adicionando 1,6 µL GreenSafe Premium (NZYTech, Lisboa, Portugal), e 800 µL de lixívia comercial (Aranda *et al.*, 2012). Como marcador foi utilizado o NZYDNA Ladder V (NZYTech, Lisboa, Portugal) com uma escala que varia de 100 a 1000 bp, para verificar o tamanho de cada uma das amostras de cDNA e do cDNA viral. Depois de terem sido carregados todos os poços, foi programada uma corrida do gel durante 50 minutos, a 90V no Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Os fragmentos de cDNA viral foram observados no ChemiDoc™ MP, Imaging System (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

Tabela II: Condições de RT-PCR, temperatura (°C) e tempo (minutos ou segundos) para os *primers* F2 e R3.

Temperatura (°C)	Tempo (minutos ou segundos)	
42	30 minutos	
95	5 minutos	
94	15 segundos	35 ciclos
55	30 segundos	
72	1 minuto	
72	5 minutos	

Para a quantificação das partículas virais, foi utilizado o kit SuperScript III Platinum One-Step qRt-PCR (Invitrogene, Carlsbad, EUA). Para esta etapa, foi necessário a utilização de *primers* e uma sonda específica para Betanodavírus, Noda Taq1-FW: CAACTGACARCGAHCACAC, Noda Taq1-RV: CCCACCA YTTGGCVAC, sonda 5'-6FAM-CARGCRACTCGTGGTGCVG-BHQ1-3' (Panzarin *et al.*, 2010) (Stabvida, Caparica, Portugal). Estes *primers* e a sonda foram usados com uma concentração final de 10 µM. Foi preparada uma mistura com todos os componentes da reação para um volume final de 10 µL (em triplicado) por cada poço da placa de PCR (com 96 poços) (Tabela III), para se obter uma curva padrão com diluições decimais, em que neste caso a amostra a adicionar é RNA viral. Estas diluições foram preparadas para cada uma das placas realizadas. Em cada uma das placas, as diluições de RNA viral, serviram para confirmar a eficiência da curva padrão, através de cada um dos R². Através dos *threshold cycle* (Ct) obtidos pelo *real-time*, foi possível calcular o Ct médio para cada uma das diluições, e em seguida com estes valores médios e cada uma das diluições e através de

uma regressão linear, foi possível obter uma equação linear ($y = mx + b$) para cálculo do *Median Tissue Culture Infectious Dose* (TCID₅₀/mL) das amostras.

Tabela III: Componentes e respetivo volume a adicionar (μL), para a mistura da reação utilizada no qPCR.

Componentes	Volume a adicionar (μL)
SuperScript III	0,2
2x Reaction Mix	5
Noda Taq1-FW	0,45
Noda Taq1-RV	0,45
Sonda	0,3
RNase-free water	1,1
Amostra (RNA)	2,5
Volume final = 10 μL	

A mistura da reação presente na Tabela III foi preparada de igual forma para cada uma das amostras e distribuída por cada um dos poços da placa, sendo executadas as condições descritas na Tabela IV, através da utilização do CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

Tabela IV: Etapas, número/ciclos de repetições, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (minutos ou segundos) para qPCR.

Etapas	Repetições	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (minutos ou segundos)
1	1	55	10 minutos
2	1	95	5 minutos
3	40 ciclos	95	15 segundos
		60	1 minuto

10. Análise estatística

Os dados da performance de crescimento, parâmetros sanguíneos e plasmáticos, biomarcadores do *stress* oxidativo, expressão de genes e quantificação de vírus estão expressos com o valor médio \pm desvio-padrão. Foi testada a normalidade dos dados, usando o teste de Shapiro-Wilk. Em seguida realizou-se uma comparação de médias através de uma análise de variância unidirecional (ANOVA), sempre que os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância fossem cumpridos. Quando este teste demonstrou significância, as médias foram comparadas através de um teste de comparação múltipla, teste de Tukey. Caso, as premissas da ANOVA fossem rejeitadas, procedeu-se à realização de um teste não-paramétrico, teste de Kruskal-Wallis. As

diferenças estatisticamente significativas foram testadas com $P < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados no software SPSS (versão 27, IBM, EUA).

III. Resultados do ensaio de alimentação com dieta suplementada com os extratos

1. Performance de crescimento

Os resultados da performance de crescimento do ensaio de alimentação com as dietas suplementadas com os extratos, fornecidas a *D. labrax*, durante 52 dias, estão apresentados na Tabela V. Durante este período, não foi observada mortalidade em nenhum dos tratamentos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) entre os diferentes tratamentos, em cada um dos índices analisados.

Tabela V: Parâmetros de performance de crescimento, peso inicial (Wi) e final do corpo (Wf), peso corporal médio (ABW), peso ganho (WG), ingestão voluntária de alimento (VFI), índice de crescimento diário (DGI) e taxa de conversão alimentar (FCR) em *D. labrax*, alimentados durante 52 dias com diferentes tratamentos. Os valores estão expressos com média \pm desvio-padrão (n = 42 para o peso inicial e final do corpo) (n = 3 para WG, VFI, DGI e FCR). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

	469 (12 mg/kg)	469 (6 mg/kg)	558 (306 mg/kg)	558 (153 mg/kg)	488 (2000 mg/kg)	Dieta Controlo
Wi (g)	5,24 \pm 0,36	5,34 \pm 0,16	5,20 \pm 0,12	5,32 \pm 0,12	5,33 \pm 0,36	5,39 \pm 0,61
Wf (g)	17,52 \pm 1,28	18,24 \pm 0,23	17,56 \pm 0,66	17,69 \pm 0,77	17,62 \pm 0,45	18,30 \pm 0,97
ABW (g)	11,38 \pm 0,82	11,79 \pm 0,16	11,38 \pm 0,39	11,51 \pm 0,35	11,47 \pm 0,40	11,85 \pm 0,79
WG (%)	234,16 \pm 1,77	241,71 \pm 9,93	237,98 \pm 4,75	232,77 \pm 19,51	231,30 \pm 13,51	241,04 \pm 20,61
VFI (% peso corporal /dia)	0,64 \pm 0,03	0,62 \pm 0,00	0,63 \pm 0,02	0,64 \pm 0,01	0,64 \pm 0,02	0,63 \pm 0,02
DGI (% peso corporal /dia)	1,65 \pm 0,05	1,70 \pm 0,03	1,67 \pm 0,04	1,65 \pm 0,09	1,65 \pm 0,03	1,70 \pm 0,04
FCR	1,61 \pm 0,03	1,58 \pm 0,07	1,57 \pm 0,02	1,64 \pm 0,11	1,66 \pm 0,11	1,62 \pm 0,19

2. Análise Hematológica

O perfil hematológico em *D. labrax* alimentados com os diferentes tratamentos experimentais, durante 52 dias, estão apresentados na Tabela VI. O valor dos eritrócitos foi significativamente maior em peixes alimentados com o extrato 469 (6 mg/kg) e menor no extrato 469 (12 mg/kg). Para a contagem de leucócitos nos extratos 469 (6 mg/kg), 558 (153 e 306 mg/kg) não se observaram diferenças significativas entre si, porém quando comparados com os demais tratamentos, observaram-se diferenças. O valor de MCV foi significativamente mais elevado nos tratamentos com os extratos 469 (12 mg/kg), 558 (306 mg/kg) e 488 (2000 mg/kg) em comparação os outros tratamentos. Nos valores obtidos de cada extrato, hematócrito, hemoglobina, MCH, MCHC e contagens diferenciais de células sanguíneas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Tabela VI: Perfil hematológico, eritrócitos, leucócitos, hematócrito, hemoglobina, MCV (Volume corpuscular médio), MCH (Hemoglobina corpuscular média), MCHC (Concentração de hemoglobina corpuscular média), trombócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos em *D. labrax*, alimentados durante 52 dias com diferentes tratamentos. Os valores estão expressos com media \pm

desvio-padrão (n = 6). Diferentes letras em cada linha representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

	469 (12 mg/kg)	469 (6 mg/kg)	558 (306 mg/kg)	558 (153 mg/kg)	488 (2000 mg/kg)	Dieta Controlo
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	1,78 ± 0,77 ^a	2,64 ± 0,44 ^b	1,92 ± 0,51 ^{ab}	2,14 ± 0,39 ^{ab}	1,90 ± 0,31 ^{ab}	2,35 ± 0,22 ^{ab}
Hematócrito (%)	34,75 ± 10,37	21,20 ± 6,61	27,40 ± 3,36	19,83 ± 7,47	26,20 ± 8,53	24,67 ± 9,24
Hemoglobina (g/dL)	1,06 ± 0,60	1,24 ± 0,23	1,15 ± 0,34	1,11 ± 0,24	0,96 ± 0,32	1,33 ± 0,25
MCV (μm ³)	242,28 ± 32,48 ^a	81,56 ± 27,46 ^b	138,23 ± 24,46 ^a	96,14 ± 43,11 ^{bc}	136,16 ± 53,59 ^{ac}	103,51 ± 38,00 ^{bc}
MCH (pg/célula)	3,47 ± 0,50	2,39 ± 0,54	3,07 ± 0,73	2,69 ± 1,01	2,51 ± 0,65	2,87 ± 0,66
MCHC (g/100 mL)	1,60 ± 0,40	3,30 ± 1,49	2,23 ± 0,70	3,16 ± 1,39	2,04 ± 0,58	2,73 ± 1,48
Leucócitos (x10 ⁴ /μL)	2,57 ± 0,74 ^a	5,60 ± 0,97 ^b	6,62 ± 1,34 ^b	4,77 ± 1,51 ^b	2,57 ± 1,01 ^a	3,02 ± 1,53 ^a
Trombócitos (x10 ⁴ /mm ³)	127,20 ± 6,87	128,50 ± 12,93	124,17 ± 13,50	132,17 ± 10,03	135,80 ± 2,28	122,17 ± 28,92
Linfócitos (x10 ⁴ /mm ³)	59,80 ± 8,07	61,67 ± 8,78	64,00 ± 17,46	53,00 ± 10,71	54,00 ± 5,24	63,50 ± 14,61
Monócitos (x 10 ⁴ /mm ³)	6,20 ± 0,45	4,17 ± 3,66	4,50 ± 3,39	6,67 ± 3,08	3,60 ± 2,30	7,67 ± 8,85
Neutrófilos (x 10 ⁴ /mm ³)	6,80 ± 2,77	5,67 ± 3,39	7,33 ± 3,33	8,17 ± 1,94	6,60 ± 1,82	6,67 ± 5,79

3. Parâmetros plasmáticos

3.1. Glucose

Os valores obtidos para a quantificação da glucose plasmática em *D. labrax* (Figura 6), apresentou um valor mais elevado nos peixes alimentados com o extrato 469 (12 mg/kg), apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparado com os outros extratos ($P < 0,05$).

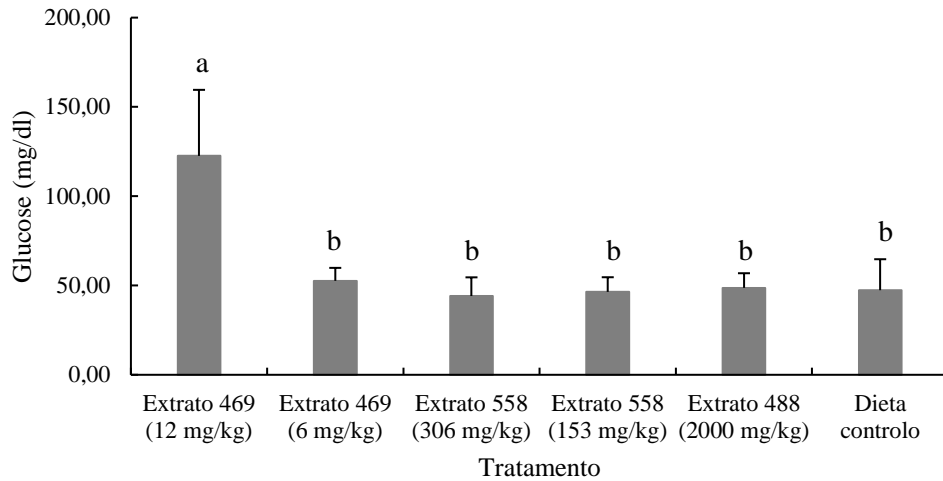


Figura 6: Glucose plasmática em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

3.2. Parâmetros de resposta imune

3.2.1. Concentração da Lisozima

Para a concentração da lisozima em *D. labrax* (Figura 7), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($P > 0,05$).

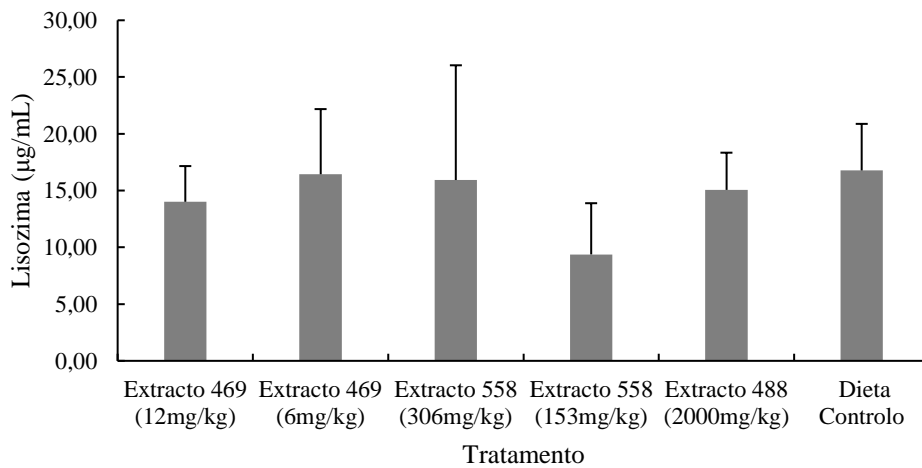


Figura 7: Atividade da lisozima em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

3.2.2. Atividade da Peroxidase

Para a atividade da peroxidase em *D. labrax* (Figura 8), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($P > 0,05$).

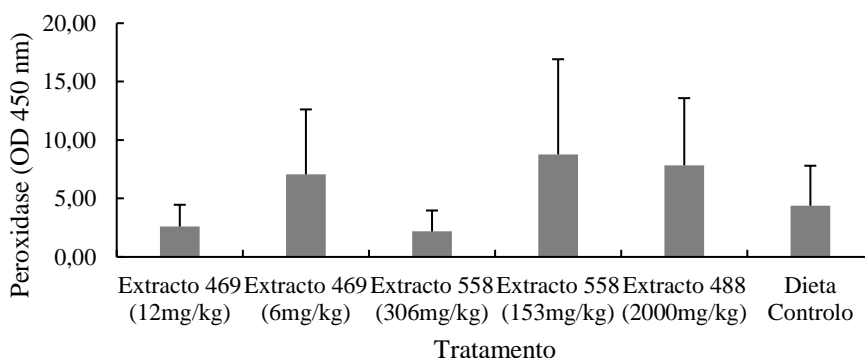


Figura 8: Atividade da peroxidase em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) ($n = 6$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

4. Biomarcadores de *stress* oxidativo

4.1. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase em *D. labrax* (Figura 9), foi semelhante entre os tratamentos e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($P > 0,05$).

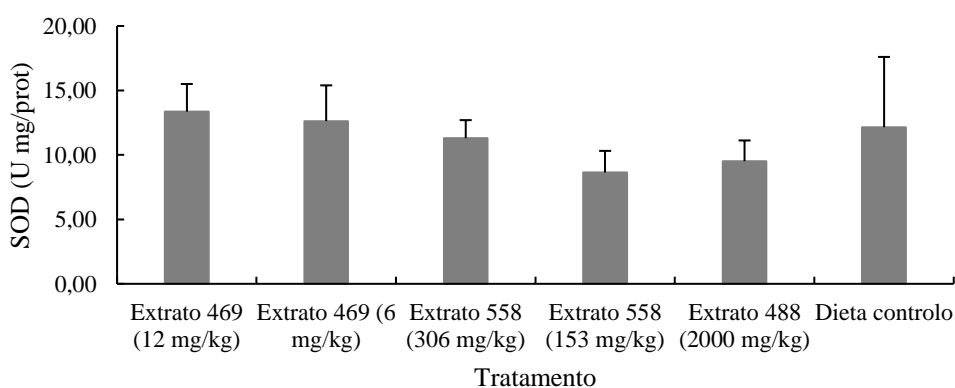


Figura 9: Atividade da Superóxido dismutase (SOD) em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) ($n = 6$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

4.2. Catalase (CAT)

A atividade da catalase em *D. labrax* (Figura 10), apresentou um valor significativamente mais elevado ($P < 0,05$) nos peixes alimentados com o extrato 488 (2000 mg/kg).

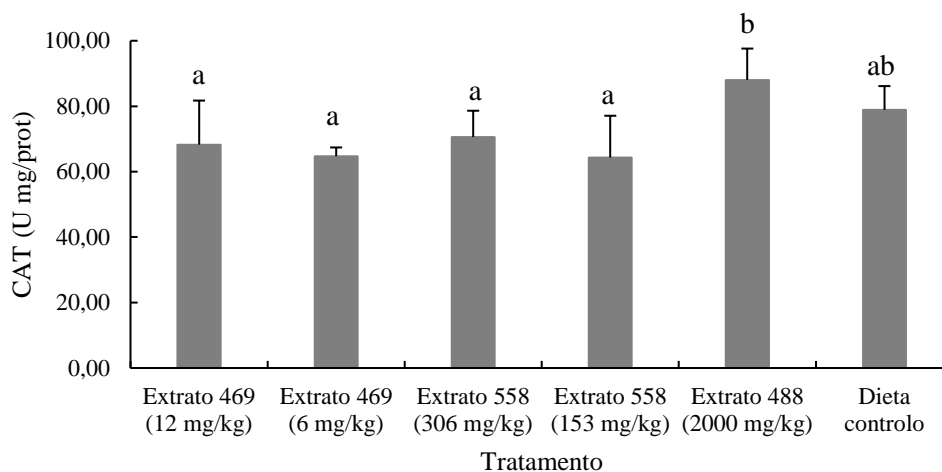


Figura 10: Atividade da Catalase (CAT) em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) ($n = 6$). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

4.3. Peroxidação lipídica (LPO)

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na peroxidação lipídica (Figura 11) em *D. labrax* ($P > 0,05$).

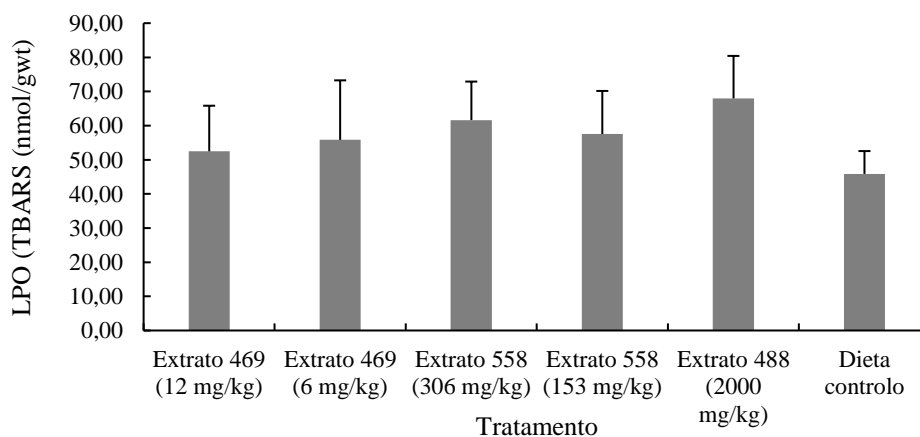


Figura 11: Peroxidação lipídica (LPO) em *D. labrax*, alimentados com os diferentes tratamentos, durante 52 dias (média \pm desvio-padrão) (n = 6). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

5. Expressão de genes

5.1. Avaliação da quantidade e qualidade do RNA extraído

A concentração de RNA variou entre 71,85 ng/ μ L e 725,40 ng/ μ L, o rácio 260/280 nm variou entre 2,09 e 2,10, e rácio 260/230 nm entre 2,20 e 2,37 (Em anexo, tabela II). Estes valores de rácios encontram-se nos intervalos aceitáveis e ideais para ambos os casos. Uma das amostras do extrato 488 (2000 mg/kg) apresentou rácios, tanto 260/280nm como 260/230nm com valores mais reduzidos (1,86 e 1,17, respetivamente), indicando a presença de algum contaminante orgânico, o mesmo aconteceu no extrato 469 (6 mg/kg) em duas das amostras que apresentaram rácios de 260/230nm baixos (1,77 e 1,87). Quando analisada a integridade do RNA em eletroforese de gel de agarose 2%, todas as amostras apresentaram integridade (Em anexo, figura 1).

5.2. Expressão de genes em cada um dos tratamentos

Foi avaliada a expressão de vários genes, o de referência, gene de *stress*, genes de imunidade inata e adaptativa. O gene de referência escolhido para uniformização dos dados foi o β -actin (*actb*), onde não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) (Figura 12), e como tal pôde ser utilizado como forma de padronização de todos os genes em análise. *Heat shock protein (hsp-90)*, um gene de *stress*, não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os diversos extratos ($P > 0,05$) (Figura 13).

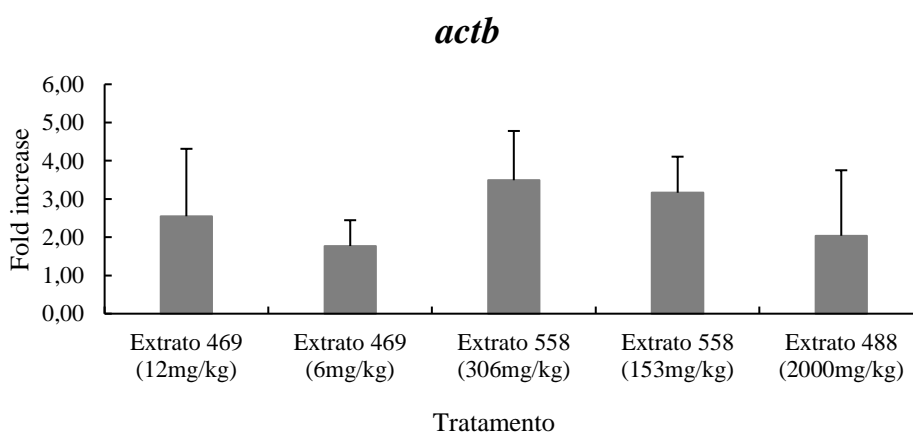


Figura 12: Expressão quantitativa do gene de referência β -actin (*actb*), no rim cranial de *D. labrax* após o ensaio de crescimento com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão (n = 6). Não foram registadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

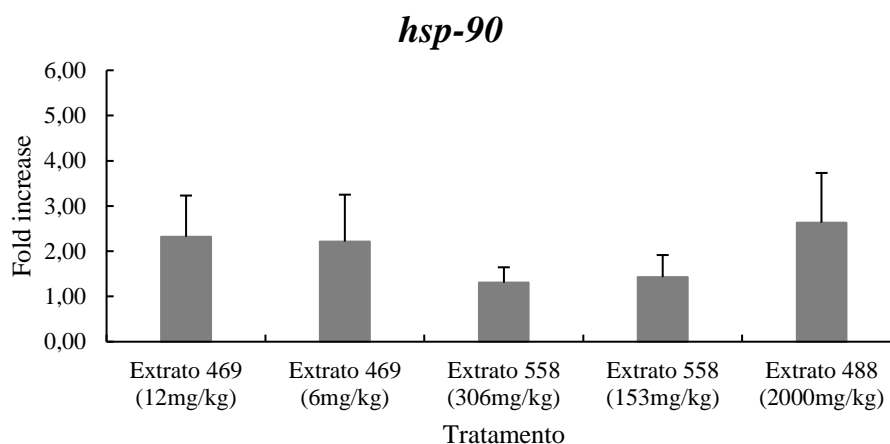


Figura 13: Expressão quantitativa do gene de stress, *Heat shock protein (hsp-90)* no rim cranial de *D. labrax* após o ensaio de crescimento com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão (n = 6). Não foram registadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Relativamente aos genes de imunidade inata, o gene *TNF receptor/associated factor 3 (Traf3)* apresenta uma regulação positiva mais elevada no extrato 469 (12 mg/kg) e mais reduzida no extrato 558 (153 mg/kg), apresentando entre estes dois tratamentos diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) (Figura 14A). *Toll-like receptor, pathogen recognition (tlr9)* (Figura 14B) apresenta uma expressão idêntica nos extratos 469 (6 e 12 mg/kg) e extrato 558 (306 mg/kg), com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) com o extrato 488 (2000 mg/kg). Porém, apesar das diferenças, o extrato 558 (153 mg/kg) tem uma regulação similar com todos os tratamentos. Os extratos 469 (12 e 6 mg/kg) exibem uma regulação superior e estatisticamente diferente ($P < 0,05$) em comparação com o extrato 558 (153 mg/kg) para o gene *dsRNA dependent protein kinase receptor (pkr)* (Figura 14C). A expressão dos genes Interleucina 6 (*il-6*), 8 (*il-8*) e 10 (*il-10*), (Figura 15 A, B, C, respetivamente) apresentam um padrão semelhante com uma regulação mais elevada e com diferenças estatisticamente significativas nos extratos 469 com as duas concentrações diferentes (12 e 6 mg/kg) em comparação com os dois extratos 558 (306 e 153 mg/kg) ($P < 0,05$). *IFN regulatory factor 3 (irf3)* (Figura 16 B), além de apresentar uma regulação semelhante entre os extratos 469 (12 e 6 mg/kg), é possível observar que o extrato 469 (6 mg/kg) tem uma regulação um pouco superior

face ao mesmo extrato de concentração mais elevada. Estes dois extratos, têm ambas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) perante o extrato 558 (153 mg/kg), o qual apresenta a expressão mais reduzida e também estatisticamente diferente do extrato 488 (2000 mg/kg). Nos genes Interleucina 1 β (*il-1 β*) (Figura 15 D), IFN tipo I (*ifn*) (Figuras 16A) e IFN *regulatory factor 7* (*irf7*) (Figuras 16C), não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($P > 0,05$). Em todos os genes, onde existem diferenças estatisticamente significativas, é possível observar uma tendência para uma regulação mais elevada nos extratos 469 (12 mg/kg) e 469 (6 mg/kg) em comparação com os outros extratos.

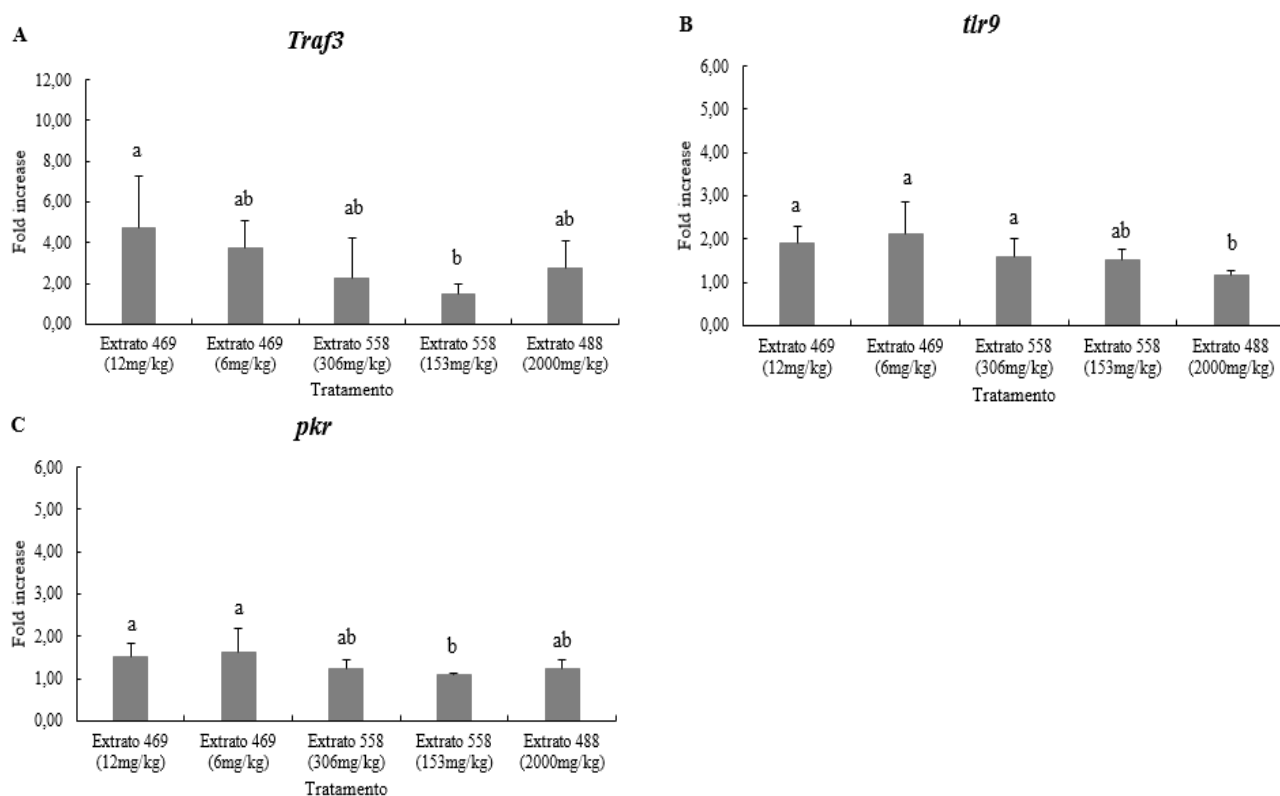


Figura 14: Expressão quantitativa de genes de imunidade inata, (A) TNF *receptor/associated factor 3* (*Traf3*); (B) *Toll-like receptor, pathogen recognition* (*tlr9*); (C) *dsRNA dependent protein kinase receptor* (*pkr*), no rim cranial de *D. labrax* após ensaio de alimentação com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão ($n = 6$). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

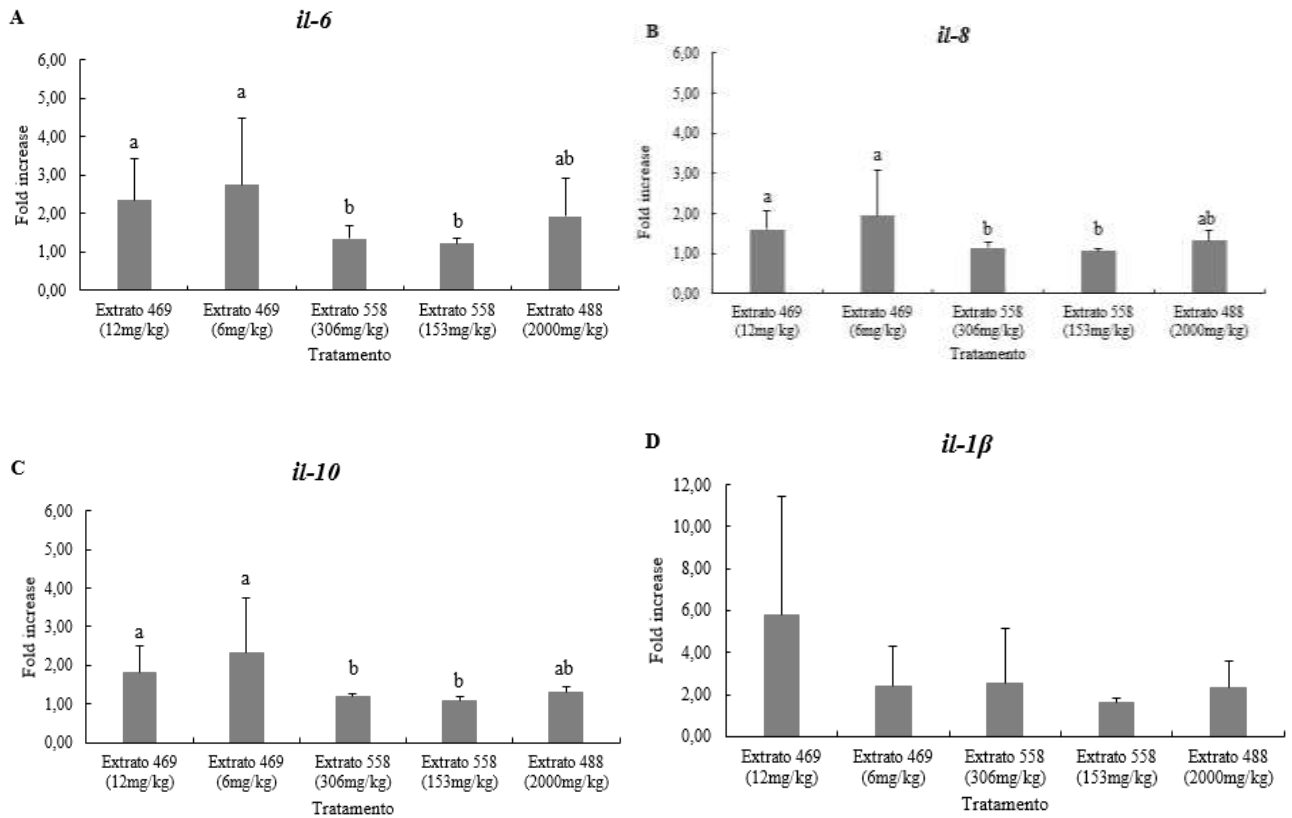
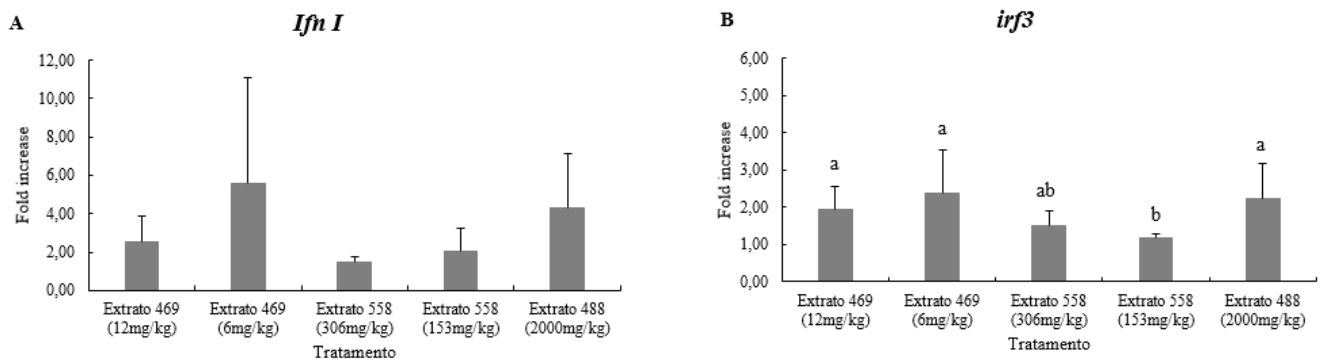


Figura 15: Expressão quantitativa de genes de imunidade inata, (A) *Interleukin 6 (il-6)*; (B) *Interleukin 8 (il-8)*; (C) *Interleukin 10 (il-10)*; (D) *Interleukin 1 β (il-1β)*, no rim cranial de *D. labrax* após ensaio de alimentação com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média ± desvio-padrão (n = 6). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$)



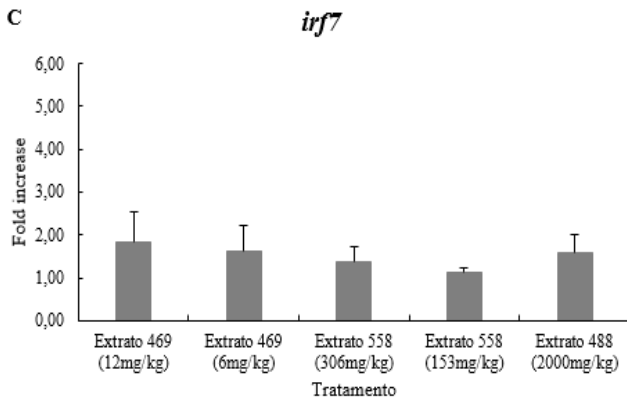


Figura 16: Expressão quantitativa de genes de imunidade inata, **(A)** Type I IFN (*ifn*); **(B)** IFN *regulatory factor 3* (*irf3*); **(C)** IFN *regulatory factor 7* (*irf7*), no rim cranial de *D. labrax* após ensaio de alimentação com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão ($n = 6$). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$)

Para ambos os genes de imunidade adaptativa Imunoglobulina *mu heavy chain* (*ighm*) e Imunoglobulina *tau heavy chain* (*ight*), não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os diversos extratos ($P > 0,05$) (Figura 17A e B, respetivamente).

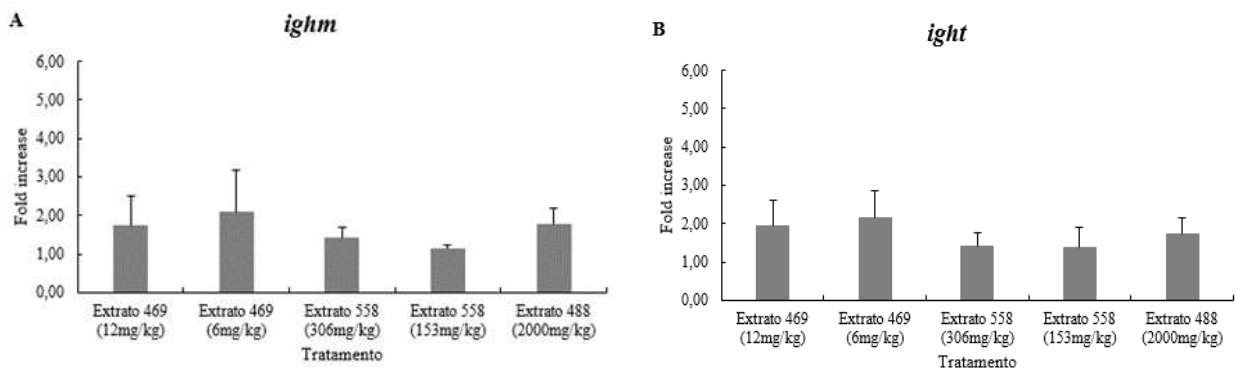


Figura 17: Expressão quantitativa dos genes de imunidade adaptativa, **(A)** *Immunoglobulin mu heavy chain* (*ighm*) e **(B)** *Immunoglobulin tau heavy chain* (*ight*) no rim cranial de *D. labrax* após ensaio de crescimento com os diferentes extratos fornecidos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio-padrão ($n = 6$). Não foram registadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

IV. Resultados após a infecção

1. Mortalidade

A mortalidade foi registada desde o início da infecção (dia 0) até ao fim do ensaio (dia 21) (Figura 18). Não se registou mortalidade nos peixes não infetados e, nos peixes infetados, a mortalidade foi observada em todos os tratamentos. A dieta controlo foi o tratamento que apresentou um valor mais elevado de mortalidade, 44,48%. Segue-se o tratamento com o extrato 488 (2000 mg/kg) com 38,92% e, o extrato 469 (6 mg/kg) com 33,36%. Os extratos 469 (12 mg/kg) e 558 (153 mg/kg) com 27,80%. O extrato que apresentou mortalidade mais baixa, 22,24%, foi o extrato 558 (306mg/kg). O início da mortalidade no ensaio foi registado ao 7º dia após a infecção na dieta controlo, extrato 488 (2000 mg/kg) e no extrato 558 (153 mg/kg). Por outro lado, nos extratos 469 (6mg/kg), 469 (12mg/kg) 558 (306 mg/kg), a mortalidade teve início ao 9º dia após a infecção. Não foram registadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

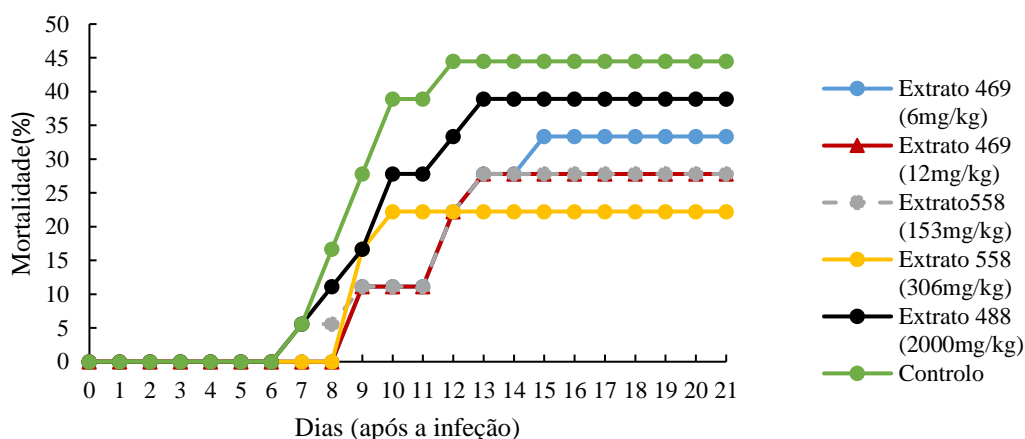


Figura 18: Cinética de mortalidade para os peixes infetados com VNN, alimentados com os diferentes tratamentos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão ($n = 3$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

2. Parâmetros da resposta imune

2.1. Concentração de Lisozima

A concentração de lisozima nos peixes não-infetados e peixes infetados com VNN foi avaliada ao 7º dia após a infecção nos diversos tratamentos através da análise do plasma. Quando comparados os extratos e dieta controlo entre si, nos diferentes momentos da infecção (não-infetados e infetados) não foram observadas diferenças

estatisticamente significativas ($P > 0,05$) (Figura 19), exceto no extrato 469 (12 mg/kg) ($P < 0,05$).

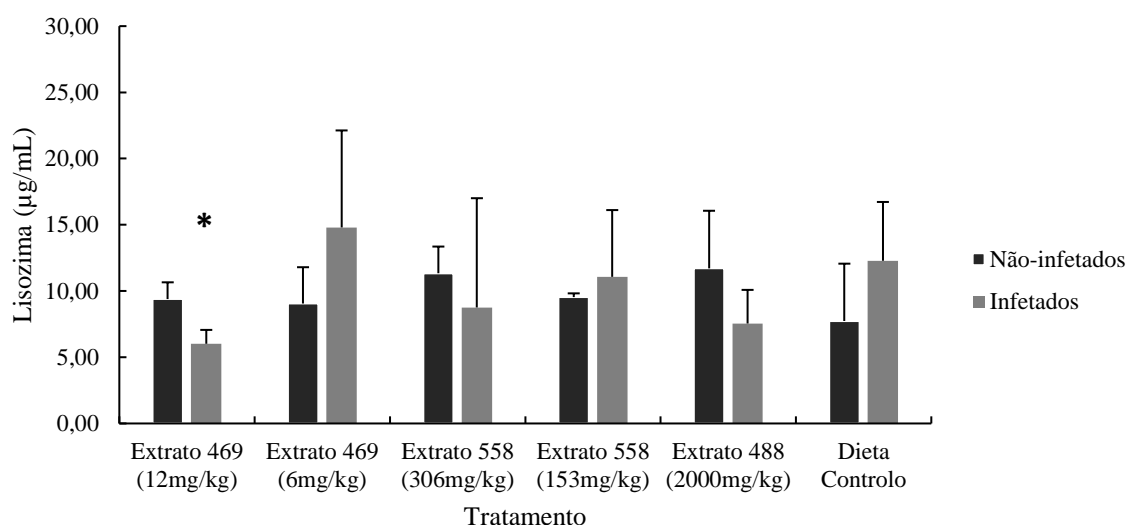


Figura 19: Concentração de lisozima em *D. labrax* ao 7º dia após a infecção com VNN nos diferentes tratamentos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão ($n = 3$). Existem diferenças estatisticamente significativas, quando apresentado o símbolo * num determinado tratamento, em comparação os diferentes momentos da infecção (não-infetados e infetados) ($P < 0,05$).

2.2. Atividade da Peroxidase

A atividade da peroxidase, à semelhança com a concentração de lisozima, também foi avaliada ao 7º dia após a infecção (nos peixes não-infetados e infetados) com VNN, nos diferentes tratamentos. Como é possível observar na Figura 20, só existem diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre peixes não infetados e peixes infetados na dieta controlo, sendo que os infetados apresentam um valor da atividade desta enzima bastante reduzido quando comparado com os não-infetados.

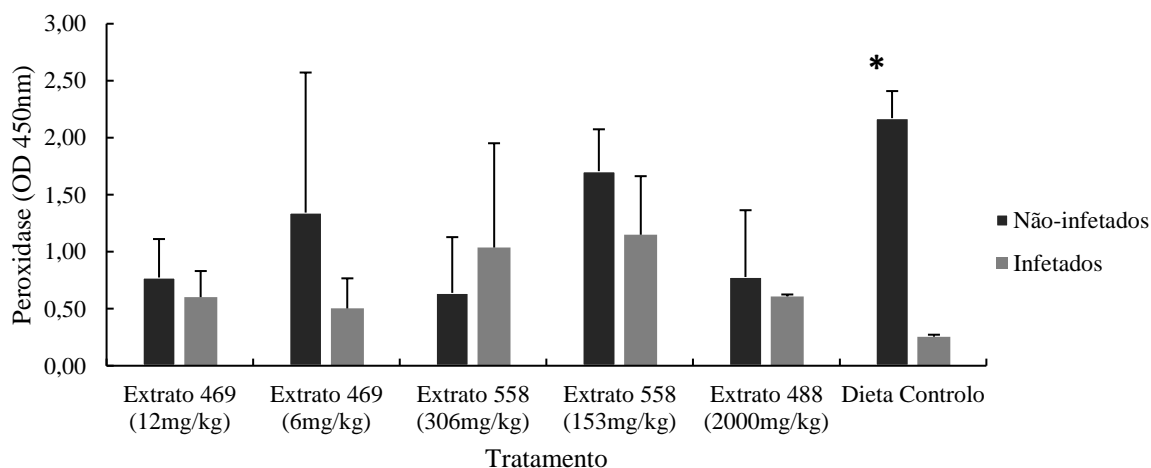


Figura 20: Atividade da peroxidase em *D. labrax* ao 7º dia após a infeção nos diferentes tratamentos. Estes resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão ($n = 3$). Existem diferenças estatisticamente significativas, quando apresentado o símbolo * num determinado tratamento, em comparação os diferentes momentos da infeção (não-infetados e infetados) ($P < 0,05$).

3. Análise histológica

Nas amostras de cérebro de peixes não-infetados não foram observadas alterações no Mesencéfalo (*Tectum* ótico) e Metencéfalo (*Cerebellum*) (Figura 21A e C, respetivamente). Por outro lado, nos cérebros dos peixes infetados observaram-se alterações no Mesencéfalo com vacuolização e degeneração de neurónios (Figura 21B), e degeneração das células de Purkinje no Metencéfalo (Figura 21D).

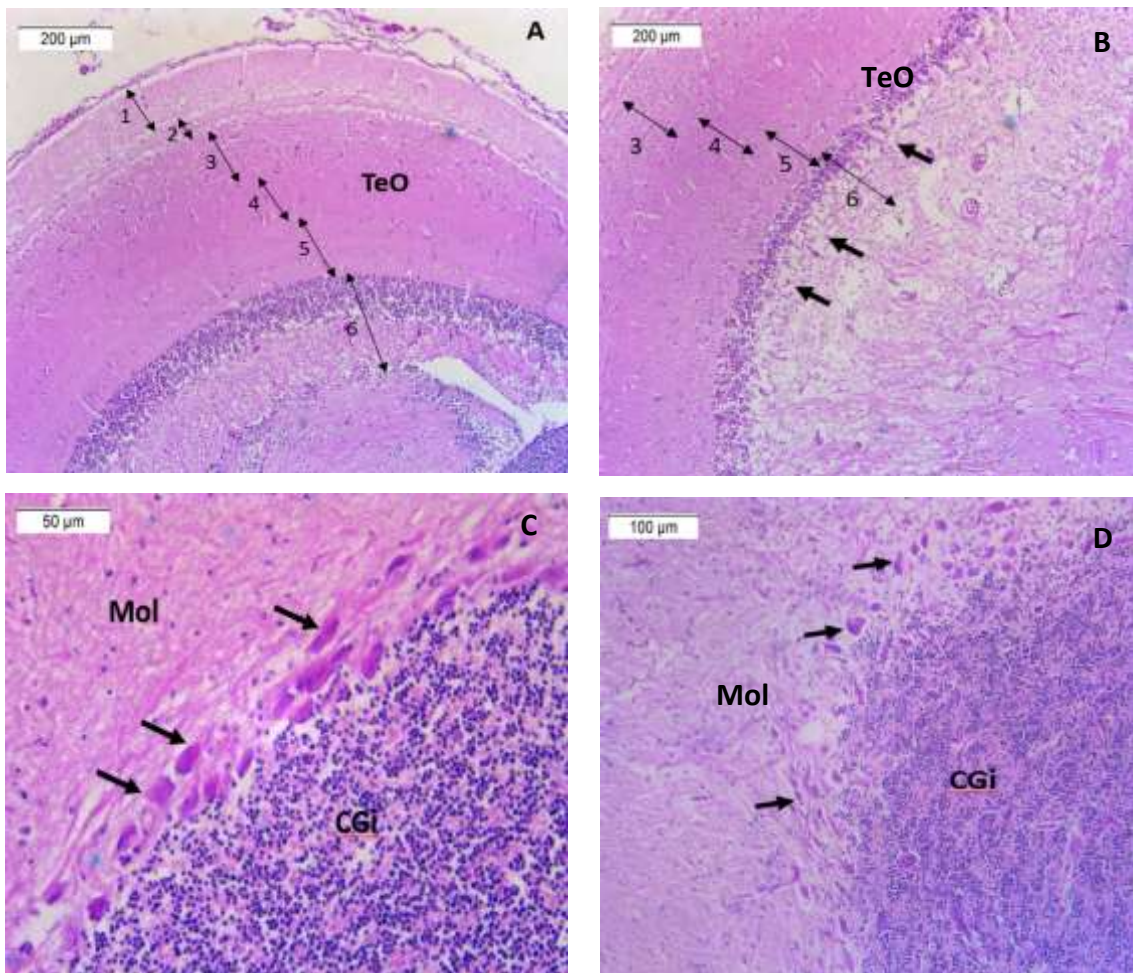


Figura 21: Histopatologia do cérebro de *D. labrax* antes e depois da infeção com NNV, H&E. (A) Mesencéfalo normal, constituído pelo *tectum* ótico (TeO) que é composto por seis camadas distintas: (1) *stratum marginale*, (2) *stratum opticum*, (3) *stratum fibroetgriciale*, (4) *stratum album central*, (5) *stratum griseum central* e (6) *stratum periventriculae*, 100x; (B) Mesencéfalo de um peixe infetado, com vacuolização, degeneração e necrose dos neurónios (setas) no *tectum*

ótico (TeO) com o (3) *stratum fibroetgriciale*, (4) *stratum album central*, (5) *stratum griseum central* e (6) *stratum periventriculae* visíveis, 100x; (C) Metencéfalo (*cerebellum*) normal, com três camadas distintas, camada molecular externa (Mol), células de Purkinje (setas) e camada granular interna (CGi), 400x; (D) Metencéfalo (*cerebellum*) com degeneração visível nas células Purkinje (setas) camadas molecular externa (Mol) e granular interna (CGi), 200x.

4. Quantificação de vírus

4.1. Avaliação da quantidade e qualidade do RNA extraído

Após a extração de RNA, procedeu-se à sua avaliação relativamente à quantidade e qualidade. A concentração de RNA no tecido cerebral variou entre 43,5 ng/μL e 488,2 ng/μL, com rácio de 260/280 nm entre 1,90 e 2,11 e rácio 260/230 nm entre 1,42 e 2,42 (Em anexo, tabela IV). Estes intervalos de valores, sugerem que possam ter ocorrido algumas contaminações na etapa de extração de RNA, principalmente no momento da recolha do fluxo e respetiva colocação nas colunas de sílica. Os rácios 260/280 nm encontra-se em intervalos ideais e aceitáveis. Em termos de qualidade de RNA, foi avaliada a integridade de cada uma das amostras através de uma eletroforese em gel de agarose 2%, as quais demonstraram integridade, sem que tenha sido observado degradação de RNA (Em anexo, figura 2).

4.2. Detecção de Betanodavírus através de eletroforese

Uma etapa importante antes da quantificação de VNN em *real-time*, e é deteção da presença de vírus através de uma eletroforese em gel de agarose 2%. Como marcador foi utilizado o NZYTech Ladder V (NZYTech, Lisboa, Portugal), sabendo que a presença de Betanodavírus é específica e detetada em 430bp (Bandín e Souto, 2020). Todas as amostras de peixes não infetados, peixes infetados e peixes moribundos foram utilizadas para avaliar a presença do vírus. Os produtos amplificados resultantes da síntese de cDNA (Figura 22) revelaram que todas as amostras de peixes infetados e de moribundos apresentaram bandas específicas para a presença de Betanodavírus. No entanto, a amostra F1 correspondente a um peixe não infetado, apresentou uma banda específica deste vírus (Figura 22A, tracejado a amarelo).

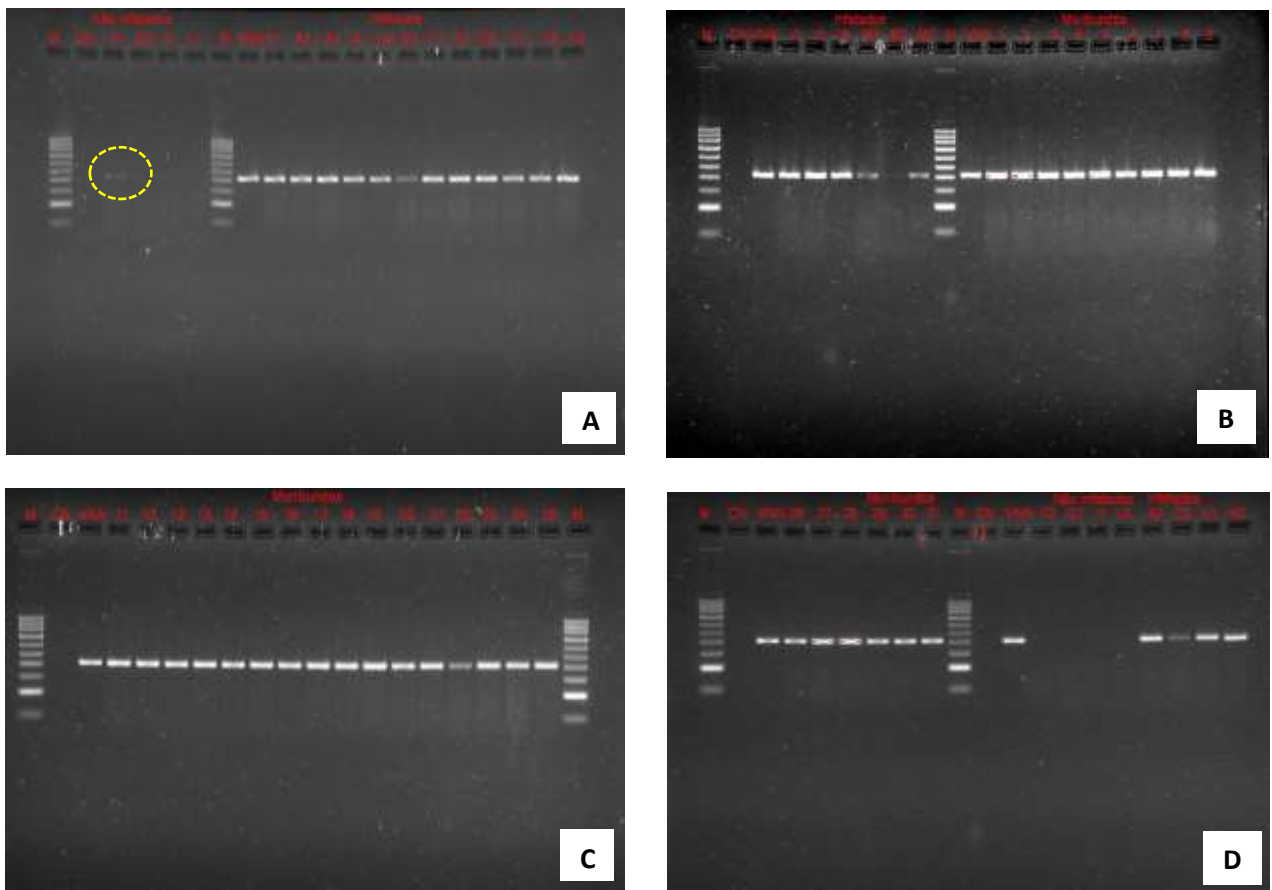


Figura 22: Detecção da presença de Betanodavírus (430bp, Bandín e Souto, 2020) através da utilização do marcador NZYTech Ladder V (NZYTech, Lisboa, Portugal) utilizando amostras de cDNA. **(A)** peixes não-infetados (F1,2,3 – Extrato 469 (12 mg/kg), G1,2,3 - Extrato 469 (6 mg/kg), I1,2,3 - Extrato 488 (2000 mg/kg), L1,2,3 - Extrato 558 (306 mg/kg)) e peixes infetados (A1,2,3 - Extrato 469 (12 mg/kg), D1,2,3 - Extrato 558 (306 mg/kg), E1,2,3 - Extrato 558 (153 mg/kg), H1,2,3 - Extrato 488 (2000 mg/kg)); **(B)** peixes infetados (J1,2,3 – Dieta controlo, M1,2,3 - Extrato 469 (6 mg/kg)) e peixes moribundos (de 1 a 9), **(C)** peixes moribundos (10-25); **(D)** peixes moribundos (26 a 31), e confirmação da presença de vírus em alguns peixes não-infetados (F2, G1, I1, L3) e peixes infetados (A2, D3, E1, H2). **M** – marcador molecular com escala de 100bp; **CN** – controlo negativo, **VNN** – cDNA viral.

4.3. Quantificação de vírus em *Real-time*

A curva padrão preparada através de diluições de RNA viral, permitiu estabelecer uma regressão linear entre todos os Ct médios de cada uma das diluições, sabendo que o VNN se encontrava à concentração de $TCID_{50}=10^6$ /mL. A equação da reta utilizada foi a seguinte: $y = -3,4144x + 36,743$, com $R^2=0,9842$ (Figura 23). Através da equação desta reta, foi possível determinar a quantidade de vírus presente em cada uma das amostras, através da substituição de x pelo Ct médio.

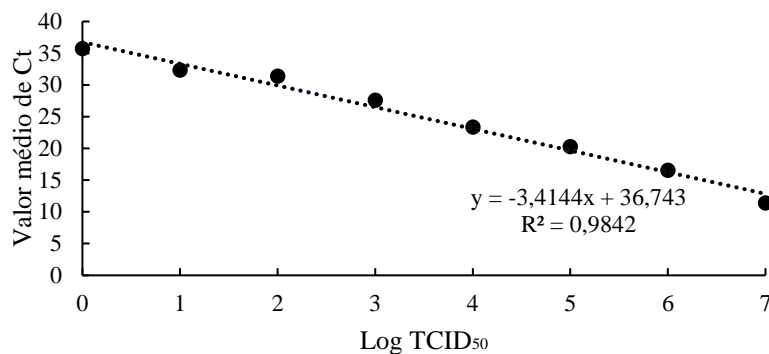


Figura 23: Curva padrão do valor médio de Ct de cada uma das amostras, de acordo com as diluições sucessivas de VNN com concentração conhecida de TCID₅₀=10⁶ /mL.

Todas as amostras de RNA foram analisadas em *real-time*, com o objetivo de quantificar a carga viral. As amostras de peixes não-infetados demonstraram Ct médios muito elevados (Ct > 35), fora do intervalo de Ct obtidos pela reta padrão. Como tal, todas estas amostras, incluindo a amostra F1 que na eletroforese deu positivo para o VNN, foram consideradas como negativas e por isso não foram quantificadas. Em relação às amostras de peixes moribundos, pelo facto de terem apresentado sinais da doença, foram utilizados para quantificar o vírus de forma a confirmar a sua presença em relação aos peixes infetados.

As amostras de peixes infetados, em cada um dos tratamentos, apresentaram valores de Ct médios dentro do intervalo de Ct da reta padrão, e como tal foram consideradas como positivas para VNN. Após quantificada a carga viral em cada um dos tratamentos (Figura 24) observa-se que o extrato 469 (6 mg/kg) apresentou o menor valor do número de cópias de VNN (1,56 x 10⁴) com diferenças estatisticamente significativas, quando comparado com os outros tratamentos. Tanto a dieta controlo como os restantes extratos mostraram valores semelhantes entre si, por volta de 10⁷, o que significa que o extrato 469 (6 mg/kg) apresentou cerca de metade do número de cópias em comparação com os demais tratamentos.

Como referido anteriormente, os sinais clínicos dos peixes sintomáticos foram observados e registados (Em anexo, Tabela III), os quais apresentaram diversos sintomas, na maioria opacidade nos olhos, exoftalmia, perda de equilíbrio e flutuabilidade, dificuldade na natação, looping, entre outros.

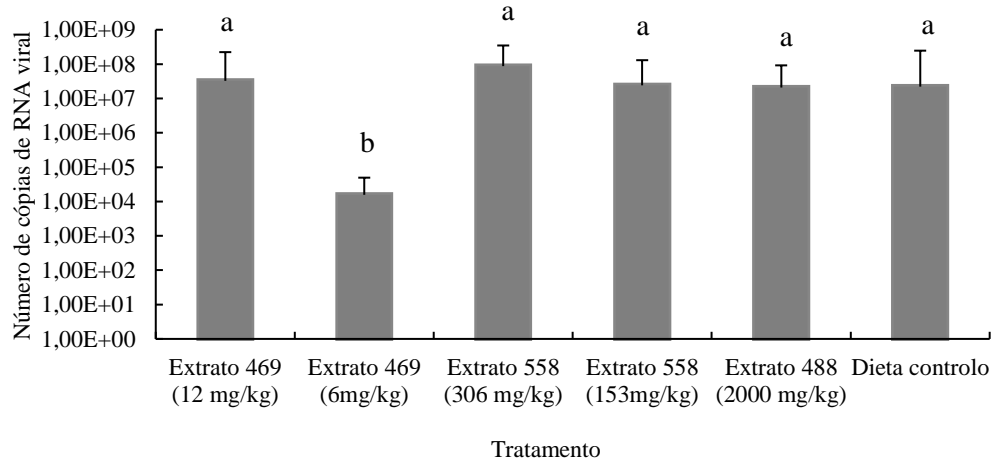


Figura 24: Quantificação de vírus no cérebro de *D. labrax* infectados, ao 7º dia após a infecção (média \pm desvio-padrão) (n = 3) em cada um dos tratamentos. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Página deixada intencionalmente em branco

V. Discussão de resultados

A melhoria da performance de crescimento dos peixes está relacionada com o aumento da sobrevivência durante o seu processo de produção e manutenção em aquacultura, reduzindo desta forma o *stress* relacionado com todas as condições a que os peixes de cultivo são expostos. Esta melhoria proporciona também um produto final com melhor qualidade, o que satisfaz o consumidor (Peixoto *et al.*, 2017). Neste estudo, *D. labrax* foram alimentados durante 52 dias com diferentes extratos, e após este período foi possível observar um aumento de peso semelhante entre todas as dietas com extratos e dieta controlo. Estes resultados sugerem as dietas com extratos não comprometem o aumento da taxa de crescimento, quando alimentados até à saciedade. Os resultados deste estudo estão de acordo com os relatados, no estudo de Peixoto *et al.*, (2016) com juvenis de *D. labrax*, Conde-Sieira *et al.*, (2016) com *S. senegalensis* e Peixoto *et al.*, (2017) com corvinas (*Argyrosomus regius*). Em todas as dietas com extratos o VFI foi semelhante entre si e também semelhante à dieta controlo, o que significa que possivelmente a inclusão de extratos nas dietas é bem aceite e palatável pelos peixes (Peixoto *et al.*, 2016; Passos *et al.*, 2021). Além dos valores de FCR entre dietas não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, o valor foi elevado entre todos os tratamentos.

Os parâmetros hematológicos são uma ferramenta amplamente utilizada como importante indicador para a avaliação do estado fisiológico (Cataldi *et al.*, 1998), nutricional e da saúde dos peixes (Abdel-Tawwab, 2016; Burgos-Aceves *et al.*, 2019). Os parâmetros hematológicos em peixes, incluem contagem de eritrócitos, leucócitos, determinação do hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC) e contagem diferencial de leucócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos (Grant, 2015; Neelima *et al.*, 2015). A análise hematológica numa aquacultura, facilita a deteção precoce de situações que possam por em causa o desempenho do cultivo (Okomoda *et al.*, 2013), melhorando a qualidade da sua produção. De acordo com Fazio *et al.*, (2015b), os parâmetros hematológicos estão interligados com o nível metabólico dos peixes, o que pode ser verificado através de uma elevada atividade metabólica e elevada procura energética durante o crescimento. Consequentemente, este aumento da atividade metabólica durante o crescimento de *D. labrax* pode ser comprovado pelo aumento do volume de eritrócitos, o que por sua vez provoca um aumento no valor do hematócrito (Fazio *et al.*, 2015b). Neste estudo, é possível verificar

que a dieta com o extrato 469 (12 mg/kg) se caracteriza pelo valor mais elevado do volume corpuscular médio (MVC) de eritrócitos, bem como a que apresenta o valor mais elevado de hematócrito, estando de acordo com o relatado (Fazio *et al.*, 2015b). Estes resultados sugerem um padrão de influência hematológica nos peixes alimentados com este extrato, nos quais é possível verificar um aumento da sua atividade metabólica e energética canalizada para o seu crescimento, durante o período de alimentação a que foram sujeitos. Sabe-se também, que existe uma relação entre o aumento da dimensão do peixe com o aumento dos valores de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina (Jawad *et al.*, 2004; Fazio *et al.*, 2015b). No entanto, neste estudo os peixes apresentaram um peso final semelhante entre as diferentes dietas, o que significa que esta relação em termos de aumento da dimensão do peixe com estes parâmetros hematológicos não se observou. Os leucócitos são células defensivas com um papel muito importante para avaliar a saúde dos peixes. Os níveis destas células têm implicações nas respostas imunológicas e na capacidade do peixe conseguir combater uma determinada infeção (Güroy *et al.*, 2014; Fazio *et al.*, 2015a; Fayed *et al.*, 2019). Neste estudo, os extratos 469 (6 mg/kg) e 558 (306 mg/kg) apresentaram os valores mais elevados de leucócitos (sem diferenças estatisticamente significativas entre eles) quando comparados com as outras dietas, sendo que o extrato 558 (306 mg/kg) apresentou o valor mais elevado. De acordo com Fazio *et al.*, (2015a), níveis mais elevados de leucócitos permite que os peixes consigam combater uma infeção de forma mais eficaz que outros, sugerindo que as dietas com os extratos 469 (6 mg/kg) e 558 (306 mg/kg) possam ter uma resposta imunológica mais eficiente.

A glucose é a principal fonte de energia do sistema nervoso central (Jahan *et al.*, 2019). De acordo com Fazio *et al.*, (2015b), no seu estudo com *S. aurata* e *D. labrax* revelou que existe uma correlação entre a glucose presente no sangue com o comprimento e peso, respetivamente. Isto é, em ambas as espécies foi verificado um aumento da glucose plasmática com o aumento dos índices biométricos, pois possivelmente ocorreu uma mobilização da glucose dos seus locais de armazenamento com o objetivo de ser usada devido ao aumento da atividade metabólica dos peixes durante o seu crescimento. É possível verificar, no presente estudo, que de todas as dietas experimentais apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas na dieta com o extrato 469 (12 mg/kg), o que é coincidente com o aumento da atividade metabólica durante o crescimento, verificada através do aumento do volume de eritrócitos e hematócrito também registado para este extrato. Por outro lado, sabe-se que a glucose é um índice

secundário de *stress*, e os seus aumentos também podem estar relacionados com um aumento da produção de energia durante e após o período de *stress* (Eslamloo *et al.*, 2014).

O *stress* oxidativo é um componente muito importante de resposta em peixes, nomeadamente quando estão expostos a stressores (Vinagre *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016). Os stressores provocam o aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), acumulando peróxido de hidrogénio, o que acaba por levar à peroxidação lipídica (Londero *et al.*, 2021), podendo danificar moléculas e o próprio sistema de defesa antioxidante (Jia *et al.*, 2016). As principais enzimas antioxidantes responsáveis pela remoção de ROS são a SOD e CAT (Sayeed *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2016), as quais são amplamente utilizadas como índices imunológicos específicos em peixes (Passos *et al.*, 2021). A SOD atua na dismutação de duas moléculas do anião $O_2^{\cdot -}$ em oxigénio molecular (O_2) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), e a CAT auxilia na degradação do peróxido de hidrogénio (Fridovich, 1995; Sharma *et al.*, 2019). Neste estudo, apesar de na atividade da SOD não se ter observado diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos é possível observar que nos extratos 488 (2000 mg/kg) e 558 (153 mg/kg) a atividade enzimática diminui, comparativamente com os outros extratos e com a dieta controlo. Por outro lado, a atividade da CAT aumentou significativamente nos peixes alimentados com o extrato 488 (2000 mg/kg). Esta enzima tem um papel muito importante na proteção contra uma possível formação de ROS no fígado, removendo peróxido de hidrogénio (Winston e Di Giulio, 1991; Magnoni *et al.*, 2017). A CAT pode ser produzida pela dismutação de $O_2^{\cdot -}$ através da atividade da SOD (Espinosa-Diez *et al.*, 2015; Londero *et al.*, 2021). Esta proteção pode ser evidenciada pelo aumento da sua atividade enzimática (Magnoni *et al.*, 2017), como é possível verificar no extrato 488 (2000 mg/kg). Sugerindo que neste extrato possa ter ocorrido produção de ROS, provocado por algum tipo de *stressor*, o que fez com que o valor da enzima CAT aumentasse, como forma de defesa antioxidante. Tal como foi relatado num estudo de Magnoni *et al.*, 2017, com juvenis de *S. aurata*, alimentados com dietas suplementadas com *Gracilaria vermiculophylla* ou *Ulva lactuca*, e posteriormente submetidos a hipoxia aguda, um *stressor* ambiental. Por outro lado, Londero *et al.*, 2021 com adição de rutina (bioflavonoide hidrossolúvel) e Pês *et al.*, 2018 com quercetina em dietas de peixe-gato (*Schilbe intermedius*), revelaram um aumento da atividade enzimática de SOD e CAT no fígado, sugerindo que além do seu papel importante na defesa do sistema enzimático, um

aumento evita a formação de produtos de peroxidação lipídica. Sharma *et al.*, 2019, realizou um estudo com a microalga *Ascochloris spp.*, em dietas de *Clarias gariepinus* (peixe-gato africano), e verificou que na dieta com o valor mais elevado de SOD e CAT um papel protetor e de defesa desta microalga contra os radicais livres. Quando se verifica um défice na atividade de enzimas antioxidantes, como é o caso da SOD e CAT, ocorre uma inibição na ação da primeira linha de defesa antioxidante, promovendo a formação de ROS, originando a peroxidação lipídica (Ighodaro e Akinloye, 2018; Londero *et al.*, 2021). De acordo com os resultados do presente estudo na atividade da CAT, seria de esperar que com o aumento significativo desta enzima na dieta com o extrato 488 (2000 mg/kg), o valor de LPO fosse menor, pelo papel que a CAT tem na degradação do peróxido de hidrogénio para inibir a peroxidação lipídica. Porém, apesar de não terem sido verificadas diferenças estatisticamente significativas de LPO entre as diferentes dietas, foi possível verificar que o valor mais elevado foi registado no extrato 488 (2000 mg/kg). Este resultado da peroxidação lipídica não está de acordo com o esperado, no entanto, este aumento no extrato 488 (2000 mg/kg) pode estar relacionado com o facto de não se ter observado um aumento da atividade enzimática da SOD, neste extrato. Todavia, como já foi mencionado, a atividade da SOD foi menor em dois extratos, nomeadamente no extrato 488 (2000 mg/kg), o que sugere que a inibição da peroxidação lipídica apenas ocorre quando se confirma um aumento conjunto atividade da superóxido dismutase e catalase, visto que a produção da CAT está dependente da dismutação de O_2^- realizada através da atividade da SOD (Londero *et al.*, 2021).

Os biomarcadores plasmáticos, nomeadamente a lisozima e peroxidase, são parâmetros muito utilizados para avaliar mecanismos de defesa imune inata e não específica (Li *et al.*, 2021; Passos *et al.*, 2021) em peixes. A lisozima atua na camada de peptidoglicano das paredes celulares de bactérias, provocando uma lise bacteriana, e a peroxidase produz produtos químicos prejudiciais como é o exemplo dos radicais oxidativos para eliminar patógenos (Nayak, 2010; Araújo *et al.*, 2016). Os neutrófilos fazem parte da fonte da lisozima e peroxidase plasmática, e o aumento dos seus níveis está também associado a um aumento de neutrófilos (Costas *et al.*, 2012). A resposta da lisozima em peixes, pode ser induzida muito rapidamente, aumentando durante uma infeção bacteriana, ou até mesmo em situações de *stress* e nutrição (Tort *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2021). Neste estudo, observou-se que após a infeção com VNN o extrato 469 (12 mg/kg) apresenta um decréscimo significativo da atividade da lisozima nos peixes

infetados face aos peixes não-infetados. Este resultado, sugere que possivelmente este extrato não teve capacidade de estimular e induzir a resposta da lisozima contra o patógeno viral ou situação de *stress* causada pela infeção. A atividade da peroxidase ao 7º dia após a infeção na dieta controlo exibiu uma redução significativa na sua atividade nos peixes infetados em relação aos peixes não-infetados, o que poderá indicar que na dieta controlo tenha ocorrido uma supressão imune devido ao *stress* (Costas et al., 2013) provocado pela presença do patógeno viral. Impossibilitando a migração de neutrófilos para o local da infeção (Nayak, 2010), apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas nestas células sanguíneas. Noutros estudos foi demonstrado que os níveis de enzimas relacionadas com o sistema imunológico, como lisozima e peroxidase, apresentavam reduções na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e *S. senegalensis* sob condições de *stress* (Costas et al., 2013; Yarahmadi et al., 2016).

O cérebro dos teleósteos possui componentes básicos semelhantes aos dos animais superiores, porém apresenta muitas diferenças na sua forma e complexidade. Este órgão encontra-se dividido em cinco regiões: o telencéfalo, o diencéfalo, o mesencéfalo (ou *tectum* ótico), o metencéfalo (*cerebellum*) e a medula oblonga (Hussein e Cao, 2018). Na presença de uma infeção viral causada por VNN o cérebro e a retina são considerados os órgãos-alvo nos quais o vírus se replica ativamente (OIE, 2019). Neste estudo, apenas foi feita amostragem de cérebro (ao 7º dia após a infeção, tanto para os peixes infetados como não-infetados). A análise histológica revelou vacuolização, degeneração e necrose de neurónios no cérebro. Lopez-Jimena et al., (2012), demonstrou danos histológicos em *D. labrax* com cerca de 10 g, 17 dpi com o genótipo RGNNV, onde é possível observar vacuolização no *cerebellum*. Em larvas de *S. aurata* (com 20-25 dae), foi observada vacuolização no mesencéfalo, degeneração vacuolar da medula espinal e diversas vacuolizações multifocais com necrose caracterizada por picnose (degeneração do núcleo da célula) e cariorrexis (durante a fragmentação do núcleo, com a cromatina dispersa no citoplasma) (Volpe et al., 2020). Podem ser observadas diferenças histológicas relacionadas com a idade dos peixes, apesar da distribuição do vírus nos tecidos ser a mesma. Lesões em larvas e juvenis, são mais proeminentes exibindo necrose severa no cérebro, enquanto que os adultos mostram menor nível de necrose no tecido, mesmo na presença de concentrações mais elevadas de vírus (Mladineo, 2003; Costa e Thompson, 2016). Em adultos sintomáticos, as lesões histológicas, por vezes são mais difíceis de detetar (OIE, 2019). As lesões e alterações no tecido cerebral dos peixes, demonstram

claramente que o VNN tem um neurotropismo com replicação em locais onde os tecidos são mais sensíveis (Johansen et al., 2004), particularmente no *tectum* ótico e no *cerebellum*, com um envolvimento menor no telencéfalo e na medula oblonga (Zorriehzahra, 2020).

O melhoramento genético tem sido amplamente estudado para determinar métodos que auxiliam na redução de doenças em aquacultura, nomeadamente a vacinação e inclusão de produtos com potencial antiviral (Yang et al., 2021). O Betanodavírus é um exemplo de um vírus em que a sua patogenicidade e resposta imune por parte do hospedeiro têm sido estudadas de forma a perceber-se como é que o melhoramento genético pode desempenhar um papel fundamental na redução da mortalidade (Moreno et al., 2020). As *Heat shock protein* (conhecidas como *molecular chaperones*) são um grupo de proteínas heterogêneas as quais são induzidas em situações de *stress*, levando à desnaturação proteica (Chaves-Pozo et al., 2019). A deficiência de nutrientes na alimentação de peixes é um fator de *stress* que prejudica o crescimento e causa inúmeras doenças. O gene *Hsp-90* é amplamente utilizado como um marcador de *stress* nutricional, funcionando como um indicador do estado da saúde do peixe quando alimentados com uma determinada dieta (Antonopoulou et al., 2013). De acordo com os presentes resultados, não existiram diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos para a expressão de *Hsp-90*, o que poderá indicar que nenhuma das dietas fornecidas causou *stress* nutricional a *D. labrax*.

Quando um vírus de ssRNA, como é o caso do VNN, é detetado pela célula ocorre uma série de sinalizações em cascata até o hospedeiro conseguir induzir uma resposta antiviral. Na mitocôndria das células do hospedeiro, após a deteção da presença de um vírus, ocorre a interação de uma proteína mitocondrial (MAVS, *mitochondrial antiviral signalling*) com a proteína intermédia *Traf3*, as quais facilitam posteriormente a interação das duas proteínas, a TANK (*TRAF family member-associated NF κ B activator*) e TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) presentes no citoplasma da célula. Os resultados da regulação significativamente inferior do *Traf3* no extrato 558 (153 mg/kg), sugerem que este extrato apresentaria (na presença de uma infeção viral) capacidade mais reduzida de interagir com a proteína MAVS, o que conseqüentemente não iria facilitar a interação de TANK e TBK1. TLRs (*Toll-like receptor*), como o *tlr9* está localizado nos endossomas iniciais e detetam vários ácidos nucleicos virais, o que indica que o endossoma representa um papel muito importante no reconhecimento e sinalização de vírus (Liu et al., 2011). O gene *tlr9*

também presente no citoplasma da célula (no caso do vírus ser ssRNA), permite também a ativação das proteínas TANK e TBK1 (Valero *et al.*, 2015b). Tendo em conta as diferenças estatisticamente significativas observadas na expressão do *tlr9*, o extrato 488 (2000 mg/kg) foi aquele teve uma regulação estatisticamente mais reduzida indicando que possivelmente as células dos peixes alimentados com este extrato, não teriam uma forma tão eficaz de reconhecer a presença deste patógeno, e conseqüentemente comunicar a jusante com as células de sinalização, como o *irf3* e *irf7*.

O gene *dsRNA dependent protein kinase receptor (pkr)* é um componente integrante da resposta imune inata, a qual é ativada por vírus de dsRNA, e identificado como um regulador de respostas antivirais (Guo *et al.*, 2019). Imediatamente após a infecção ou no início da replicação ou transcrição viral, o dsRNA pode ativar o *pkr*, levando a uma inibição geral da síntese de proteínas e potencialmente à apoptose. Como tal, a expressão deste gene é crucial para uma resposta antiviral (Rothenburg *et al.*, 2008). Neste estudo, o extrato 558 (153 mg/kg) é o único que apresenta diferenças significativas, e com a menor expressão em comparação com os extratos 469 (12 e 6 mg/kg). No entanto, o VNN é um vírus de ssRNA, e como a análise dos genes foi efetuada a amostras de peixes, antes da infecção, não é possível saber como seria a expressão deste gene na presença deste tipo vírus. Além disso, é expectável que os extratos, com regulação significativamente mais elevada, extratos 469 (12 e 6 mg/kg), poderão ter alguma uma resposta antiviral na presença de um vírus dsRNA.

Interleucinas (Il) são um tipo de citocinas expressas nos leucócitos, sendo que também podem ser produzidas noutras células do corpo do peixe. Desempenham um papel importante na ativação e diferenciação de células imunes, como a proliferação, maturação, migração e adesão. Apresentam propriedades pró e anti-inflamatórias, as quais são ativadas e funcionam como efetores e reguladores durante uma resposta inflamatória (Xiao *et al.*, 2019; Vaillant e Qurie, 2020). Também participam na resposta de fase aguda da infecção (Poisa-Beiro *et al.*, 2008). A Interleucina-6 (*il-6*) é produzida pelos linfócitos T e B, fibroblastos e macrófagos. Esta interleucina produz efeitos na diferenciação das células B e na estimulação de proteínas na fase aguda (Vaillant e Qurie, 2020). O aumento do número leucócitos no extrato 469 (6 mg/kg) está em concordância com a expressão de *il-6* neste extrato, apesar de não terem sido registadas diferenças significativas nos linfócitos. A interleucina-8 (*il-8*) é produzida pelos monócitos (células diferenciais de leucócitos) e fibroblastos, e está envolvida na resposta inflamatória e

imune (Xiao *et al.*, 2019). Interleucina-10 (*il-10*) é uma importante citocina anti-inflamatória que tem potente efeito inibitório na síntese de interleucina-2 e IFN. Sabe-se que a *il-10* é capaz de aumentar a atividade de mastócitos, células B e células T e sua expressão pode ser regulado por vários tipos de estimulação. Tal como acontece para o gene *il-6*, *il-8* e *il-10*, o extrato 469 (6 mg/kg) apresenta uma maior expressão, sendo que o seu valor é muito semelhante, e sem diferenças significativas para o mesmo extrato, mas com maior concentração 469 (12 mg/kg). A transcrição de *il-8* e *il-10* atrai e ativa neutrófilos, que regulam a inflamação e apoptose (Moreno *et al.*, 2018). Porém, como não foram registadas diferenças estatisticamente significativas na contagem de neutrófilos nestes extratos, possivelmente a expressão destes genes poderá não ter sido suficiente para ativar os neutrófilos. A interleucina *il-1 β* é um *chemoattractant* para leucócitos de peixe (Zou and Secombes, 2016) e desempenha um papel muito importante no início da resposta inflamatória (Poisa-Beiro *et al.*, 2008). Quando ocorre uma estimulação de leucócitos, esta pode levar ao aumento de migração celular devido à rápida libertação de iões intracelulares de Ca⁺, causados pela infeção, como uma regulação positiva de níveis de transcrição de recetores de quimiocinas nas células-alvo. Como tal, uma estimulação de *il-1 β* aumenta a produção de quimiocinas nas células do local da infeção (Zou e Secombes, 2016). Apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos, o extrato 469 (12 mg/kg) apresenta uma expressão mais elevada quando comparada com os outros extratos. O que sugere que este extrato possa ter levado a uma estimulação do *il-1 β* , disputando a produção de quimiocinas, e estimulando a migração de leucócitos até ao local da infeção (Machado *et al.*, 2018), caso estivesse perante um agente infeccioso. Como verificado pelo valor significativamente reduzido destas células sanguíneas no extrato 469 (12 mg/kg). No estudo de Poisa-Beiro *et al.*, (2008), foi verificado que quando se observa uma elevada regulação desta citocina, também se detetam danos no tecido cerebral. Porém, no presente estudo não foram verificadas diferenças significativas na sua expressão que se possam relacionar com os danos verificados no cérebro.

O início do aparecimento dos sinais clínicos ocorreu ao 7º dia após a infeção, com exoftalmia, opacidade ocular, perda de equilíbrio e flutuabilidade, dificuldade na natação, *looping*, coincidindo com o início da mortalidade, alterações histológicas e quantidade de partículas virais presente no tecido cerebral. No estudo de Toffan *et al.*, (2016), o início dos sinais clínicos, ocorreu entre 5 a 10 dpi, coincidindo com o início da mortalidade. Em

termos de quantificação de vírus, o extrato 469 (6 mg/kg) apresentou o menor valor de cópias de VNN, em comparação os outros extratos. Perante estes resultados, este extrato possivelmente apresentou uma maior capacidade de reduzir a replicação do vírus, apesar de ter sido registada uma mortalidade de 33,36%, inferior à mortalidade registada na dieta controlo e extrato 488 (2000 mg/kg). Os outros tratamentos apresentaram uma mortalidade inferior à registada no extrato 469 (6 mg/kg). O que sugere, que apesar de ter ocorrido redução da replicação viral, o extrato 469 (6 mg/kg) não teve a capacidade de neutralizar o vírus, provocando a morte de peixes. Os resultados para este extrato, também estão de acordo com o aumento da expressão do gene *irf3*, um interferão responsável pela redução da replicação deste tipo de vírus (Yang *et al.*, 2021). Os interferões Tipo I (IFN I) são citocinas que são induzidas por infeções virais, produzindo um estado antiviral através da ativação de interferões-genes estimulados (ISGs) (Verrier *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2018). Os IFN de fase inicial são regulados principalmente por *irf3*, e os IFNs de fase mais tardia são regulados por *irf7* (Zhang *et al.*, 2014). Ambos, após uma infeção viral, são fatores de transcrição essenciais para a regulação de IFNs tipo I, por vias de sinalização distintas, em diferentes tipos de células (Zhang e Gui, 2012). Este sistema de IFN, e a regulação do gene *irf3*, têm demonstrado um efeito crucial e muito importante para conseguir limitar e reduzir a replicação de alguns tipos de vírus em peixes, nomeadamente após uma infeção com o genótipo RGNNV, em *D. labrax*, onde já foi relatada a transcrição de alguns destes genes (Moreno *et al.*, 2018), à semelhança do presente estudo. Por outro lado, os genes *ighm* e *ight*, que têm função neutralizadora de partículas virais (Yang *et al.*, 2021), não apresentaram um aumento da sua expressão no extrato 469 (6 mg/kg), apresentando um valor semelhante com diferentes tratamentos, o que pode explicar a mortalidade em todos os tratamentos.

No estudo de Valero *et al.*, 2015b, que envolveu a identificação de várias moléculas envolvidas na cascata de ativação de IFN na gónada e cérebro de *D. labrax* e *S. aurata*, revelou que a expressão dos genes *mavs*, *traf3*, *irf3* e *irf7* é regulada positivamente na gónada e cérebro no 1º, 7º e 15º dia após a infeção com VNN (dose de 10⁶ TCID₅₀ por peixe). Perante estes resultados, Valero *et al.*, (2015b) refere que a gónada é também, à semelhança do cérebro um importante tecido onde o vírus se pode alojar e por vezes ser transmitido às gerações seguintes. Além destes dois órgãos o rim cranial, é um importante órgão imunológico e endócrino exclusivo de peixes teleósteos (Geven e Klaren, 2017; Fu *et al.*, 2021), com funções regulatórias essenciais e o órgão central para as interações

endócrinas-imunológicas e função hematopoiese (Tort, 2003). Este órgão é considerado o principal órgão imunológico em peixes (Poisa-Beiro *et al.*, 2008), e inclui, por exemplo linfócitos que produzem anticorpos e citocinas (Fu *et al.*, 2021). No presente estudo, o gene *irf3* à semelhança de Valero *et al.*, (2015b) na gónada e no cérebro, apresentou uma regulação significativamente positiva no rim cranial, com os extratos 469 (12 e 6 mg/kg), o que pode indicar mais uma vez a capacidade de ativação de um IFN Tipo I, promovendo a redução da replicação viral neste órgão, perante uma infeção. A resposta inflamatória foi sugerida como sendo especialmente importante em infeções com o genótipo RGNNV, o responsável pela intensa degeneração, principalmente vacuolização observada no cérebro e retina de animais infetados (Moreno *et al.*, 2018).

VI. Conclusão e perspectivas futuras

Atualmente, as infecções virais constituem um enorme impasse ao desenvolvido da aquicultura. Este problema, causa elevadas taxas de mortalidade na fase larvar e juvenil, sendo que em adultos o impacto por vezes também é significativo. Como consequência destas infecções, verificam-se grandes perdas económicas associadas.

Os imunoestimulantes são uma importante ferramenta com poder antiviral, auxiliando e preparando o sistema imunitário dos peixes para uma infeção viral, nomeadamente contra o VNN. É muito importante o estudo da forma com ocorre a interação patógeno-hospedeiro, e respetiva resposta do sistema imunitário do hospedeiro perante uma infeção viral, para se perceber que mecanismos moleculares estão envolvidos neste tipo de respostas. E deste modo, incluir em dietas componentes com capacidade antiviral, para estimular o sistema imunitário dos peixes, ficando assim mais protegido e apto para eliminar o patógeno, sem que os danos celulares levem à morte do hospedeiro.

Em suma, face a todas as análises realizadas ao longo deste estudo, e de acordo com os resultados apresentados, a concentração possivelmente ideal com capacidade de não só reduzir a replicação viral, mas também de neutralizar o vírus, poderia estar entre a concentração do extrato 469 (12 mg/kg) e extrato 469 (6 mg/kg). Isto porque, em alguns resultados, estes dois extratos são muito semelhantes em termos de ação antiviral. Porém, apesar dos resultados apresentados no presente estudo, são necessários mais estudos para se perceber com pormenor as características do imunoestimulante ideal para preparar e modular o sistema imunitário dos peixes, para uma infeção com VNN. Com foco no *irf3*, o gene responsável pela redução da replicação viral, e também o *ighm*, responsável pela neutralização das partículas virais, assim como outros genes envolvidos na resposta imune inata e adaptativa.

Futuramente, realizaria um estudo semelhante, com uma concentração do extrato 469 (6 e 12 mg/kg), faria análise da expressão de genes antes e após a infeção, no mesmo órgão do presente estudo. Deveria ser novamente feita a análise dos genes *irf3*, *hsp-90*, *ighm*, *il-1 β* , assim como expressão de outros genes, como:

- *Mx*: responsável pela inibição da replicação viral (Moreno *et al.*, 2020);
- *TNF α* : importante mediador na resistência contra infeções virais, regulando a inflamação e apoptose de células alvo, e desencadeia a expressão do *il-1 β* (Moreno *et al.*, 2018);

- *cd28*: o qual ativado promove a proliferação de células T produzindo citocinas e permitindo a sobrevivência celular e controlo da infeção, e também promover a homeostase nos peixes (González-Fernández *et al.*, 2021);
- *STAT3*: envolvido na formação de vacuolização no cérebro (Poisa-Beiro *et al.*, 2008);
- *hsp-70* e *30*: induzidos após uma infeção com VNN, evitando a desnaturação de proteínas (Chaves-Pozo *et al.*, 2019).

Além do cérebro para análise histológica, deveria também ser amostrada a retina. Por fim, faria quantificação de vírus no sangue, pois este usa a corrente sanguínea para se disseminar para vários órgãos, além do cérebro. A quantificação de partículas virais no sangue é uma análise não-letal, poderá fornecer informações importantes, funcionando como um biomarcador da saúde dos peixes na presença de VNN.

A análise não-letal para o reconhecimento de uma infeção com VNN é fundamental, para que não seja necessário sacrificar os peixes, e também uma futura estratégia rápida em aquacultura para evitar surtos e elevadas taxas de mortalidade.

VII. Referências Bibliográficas

- Abdel-Tawwab, M. 2016. Effect of feed availability on susceptibility of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) to environmental zinc toxicity: growth performance, biochemical response, and zinc bioaccumulation. *Aquaculture* 464. Pp 309–315
- Abdullah, A., Ramli, R., Ridzuan, M. S. M., Murni, M., Hashim, S., Sudirwan, F., Abdullah, S. Z., Mansor, N. N., Amira, S., Saad, M. Z. 2017. The presence of Vibrionaceae, Betanodavirus and Iridovirus in marine cage-cultured fish: Role of fish size, water physicochemical parameters and relationships among the pathogens. *Aquaculture Reports* 7. Pp 57–65.
- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A.E., Silva, M.T. 1998. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms* 34. Pp 27–37.
- Almeida, J.R., Oliveira, C., Gravato, C., Guilhermino, L. 2010. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. *Ecotoxicology* 19. Pp1369–1381.
- Andrade, T., Afonso, A., Pérez-Jiménez, A., Oliva-Teles, A., de las Heras, V., Mancera, J.M., Serradeiro, R., Costas, B. 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture* 438. Pp 6–11.
- Antonopoulou, E., Kentepozidou, E., Feidantsis, K., Roufidou, C., Despoti, S., Chatzifotis. 2013. Starvation and re-feeding affect Hsp expression, MAPK activation and antioxidant enzymes activity of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Parte A* 165. Pp 79-88.
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55. Pp 373–399.
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., Jorcyk, C. L. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33. Pp 366-369.
- Araújo, M., Rema, P., Sousa-Pinto, I., Cunha, L. M., Peixoto, M. J., Pires, M. A., Seixas, F., Brotas, V., Beltrán, C., Valente, L. M. P. 2016. Dietary inclusion of IMTA-cultivated *Gracilaria vermiculophylla* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response. *Journal of Applied Phycology* 28. Pp 679-689.
- Arimoto M., Mushiake K., Mizuta Y., Nakai T., Muroga K., Furusawa I. 1992. Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fish Pathology*, 27. Pp 191-195.
- Azad, I.S., Jithendran, K.P., Shekhar, M.S., Thirunavukkarasu, A.R., De La Peña, L.D. 2006. Immunolocalisation of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)—A case study. *Aquaculture* 255. Pp 39–47.
- Babayi, H., Kolo, I., Okogun, J.I., Ijah, U.J. 2004. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms, *Biokemistri* 16. Pp 106–111.
- Ball, L., Hendry, D., Johnson, J., Ruechert, R., Scotti, P. 2000. Family Nodaviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee*

- on Taxonomy of Viruses; Van Regenmortel, M.H., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Cartens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Manilo, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., et al., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA. Pp. 747–755.
- Bandín, I., Souto, S. 2020. Betanodavirus and VER Disease: A 30-year Research Review. *Pathogens* 9 (2), 106. MDPI.
 - Bellance, R., Gallet de Saint-Aurin, D. 1998. L'encephalite virale de loup de mer. *Caraibes Medical* 2. Pp 105–114.
 - Bird, R.P., Draper, A.H. 1984. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods in Enzymology* 90. Pp 105–110.
 - Bitchava, K., Chassalevris, T., Lampou, E., Athanassopoulou, F., Economou, V., Dovas, C.I. 2019. Occurrence and molecular characterization of betanodaviruses in fish and invertebrates of the Greek territorial waters. *Journal of Fish Diseases* 42. Pp 1773–1783.
 - Blondin, C., Fischer, E., Boisson-Vidal, C., Kazatchkine, M., Jozefonvicz, J. 1994. *Molecular Immunology* 31. Pp 245–253.
 - Bopp, S. K., Abicht, H. K., Knauer, K. 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquatic Toxicology* 86. Pp 197–204.
 - Bouharb, H., El Badaoui, K., Amechrouq, A., El Amri, J. 2014. Phytochemical and antibacterial studies on the aqueous extract of *Eucalyptus gomphocephala* DC. *Journal of Biological Research* 4. Pp 1549–1556.
 - Boutier, M., Ronsmans, M., Ouyang, P., Fournier, G., Reschner, A., Rakus, K., Wilkie, G.S., Farnir, F., Bayrou, C., Liffrog, F. 2015. Rational development of an attenuated recombinant Cyprinid herpesvirus 3 vaccine using prokaryotic mutagenesis and in vivo bioluminescent imaging. *PLoS Pathogens* 11.
 - Braun, N., de Lima, R.L., Baldisserotto, B., Dafre, A.L., de Oliveira Nuñez, A.P. 2010. Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. *Aquaculture* 301. Pp 22–30.
 - Bunnoy, A., Na-Nakorn, U., Srisapoome, P. 2020. Development of a Monoclonal Antibody Specific to the IgM Heavy Chain of Bighead Catfish (*Clarias macrocephalus*): A Biomolecular Tool for the Detection and Quantification of IgM Molecules and IgM+ Cells in Clarias Catfish. *Biomolecules*, 10, 567. Pp 1-19.
 - Burgos-Aceves, M.A., Lionetti, L., Faggio, C. 2019. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. *Science of the Total Environment* 670. Pp 1170–1183.
 - Burton, D.R., Woof, J.M. 1992. Human antibody effector function. *Advances in Immunology* 51. Pp 1–84.
 - Byadgi, O., Beraldo, P., Volpatti, D., Massimo, M., Bulfon, C., Galeotti, M. 2019. Expression of infection-related immune response in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during a natural outbreak from a unique dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*. *Fish and Shellfish Immunology* 84. Pp 62-72.
 - Carrassón, M., Soler-Membrives, A., Constenla, M., Escobar, C., Flos, R., Gil, J.M., Luzón, V., Piferrer, F., Reig, L. 2021. Information impact on consumers' perceptions towards aquaculture: Dismantling the myth about feeds for farmed fish. *Aquaculture* 544, 737137.

- Castric, J., Thiéry, R., Je_roy, J., De Kinkelin, P. 2001. Raymond, J.C. Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms* 47. Pp 33–38.
- Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A., Cataudella, S. 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: acipenseriformes): effects of temperature and stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* 121. Pp 351–354.
- OIE Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases. 2019. Chapter 2.3.12. Viral encephalopathy and retinopathy. Paris, France. Pp. 1–17.
- Chaves-Pozo, E., Bandín, I., Olveira, J. G., Esteve-Codina, A., Gomez-Garrido, J., Dabad, M., Alioto, T., Esteban, M. A., Cuesta, A. 2019. European sea bass brain DLB-1 cell line is susceptible to nodavirus: A transcriptomic study. *Fish and Shellfish Immunology* 86. Pp 14-24.
- Cheng, Y.-K.K., Wu, Y.-C.C., Chi, S.-C.C. 2017. Humoral and cytokine responses in giant groupers after vaccination and challenge with betanodavirus. *Developmental and Comparative Immunology* 67. Pp 385–394.
- Chen, O. 2016. Algal Based Edible Vaccines. United States: US 2016/0346373 A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Chen, S-P., Peng, R-H., Chiou, P. P. 2015. Modulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide on a DNA vaccine against nervous necrosis virus in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish and Shellfish Immunology* 45. Pp 919-926.
- Chen, S. P., Wu, J. L., Su, Y. C., Hong, J. R. 2007. Anti-Bcl-2 family members, zfBcl-x L and zfMcl-1a, prevent cytochrome c release from cells undergoing betanodavirus-induced secondary necrotic cell death. *Apoptosis* 12. Pp 1043–1060.
- Cho, S. Y., Kim, H. J., Lan, N. T., Han, H-J., Lee, D-C., Hwang, J. Y., Kwon, M-G., Kang, B. K., Han, S. Y., Moon, H., Kang, H. A., Kim, H-J. 2017. Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of redspotted grouper nervous necrosis virus. *Veterinary Microbiology* 204. Pp 159-164.
- Clairborne, A. 1985. Catalase activity. In: Grenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of Methods of Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp 283–284.
- Conde-Sieira, M., Salas-Leiton, E., Duarte, M. M., Pelusio, N. F., Soengas, J. L. Valente, L. M. P. 2016. Short- and long-term metabolic responses to diets with different protein: carbohydrate ratios in Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *British Journal of Nutrition* 115. Pp 1896-1910.
- Costa, J.Z., Thompson, K.D. 2016. Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology* 53. Pp 35–49.
- Costas, B., Aragão, C., Dias, J., Afonso, A., Conceição, L.E.C. 2013. Interactive effects of high quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish Physiology and Biochemistry* 39. Pp 1141–1151.
- Costas, B., Aragão, C., Soengas, J. L., Míguez, J. M., Rema, P., Dias, J., Afonso, A., Conceição, L. E. C. 2012. Effects of dietary amino acids and repeated handling on stress response and brain monoaminergic neurotransmitters in Senegalese sole

- (*Solea senegalensis*) juveniles. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology 161. Pp 18-26.
- Costas, B., Conceição, L.E.C., Dias, J., Novoa, B., Figueras, A., Afonso, A., 2011. Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). Fish and Shellfish Immunology 31. Pp 838–847.
 - Delsert, C., Morin, N., Comps, M. 1997. A Fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. Archives of Virology 142. Pp 2359-2371.
 - de Silva, S.S.; Soto, D. 2009. Climate change and aquaculture: Potential impacts, adaptation and migration. In Climate Change Implications for Fisheries and Aquaculture: Overview of Current Scientific Knowledge; Cochrane, K., de Young, C., Soto, D., Bahri, T., Eds.; FAO: Rome, Italy. Pp. 151–212.
 - Doan, Q.K., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., Allal, F. 2017. Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: A review. Journal of Fish Diseases 40. Pp 717–742.
 - Draper, H., Hadley, M. 1989. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymology 186. Pp 421–431.
 - Dugas, B., Mercenier, A., Lenoir-Wijnkoop, I., Arnaud, C., Dugas, N., Postaire, E. 1999. Immunity and probiotics. Immunology Today 20. Pp 387–390.
 - Du, Y., Tang, X., Zhan, W., Xing, J., Sheng, X. 2016. Immunoglobulin Tau Heavy Chain (IgT) in Flounder, *Paralichthys olivaceus*: Molecular Cloning, Characterization, and Expression Analyses. International Journal of Molecular Sciences 17, 1571. Pp 1-21.
 - Elansary, H.O., Salem, M.Z.M., Ashmawy, N.A., Yessoufou, K., El-Settawy, A.A.A. 2017. *In vitro* antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Eucalyptus* spp. leaf extracts related to phenolic composition. Natural Product Research 31. Pp 2927–2930.
 - Elbeshehy, E.K., Metwali, E.M., Almaghrabi, O.A. 2015. Antiviral activity of *Thuja orientalis* extracts against watermelon mosaic virus (WMV) on *Citrullus lanatus*, Saudi Journal of Biological Sciences 22. Pp 211–219.
 - Ellermann-Eriksen, S. 2005. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. Virology Journal 2. P 59.
 - Eslamloo, K., Akhavan, S. R., Fallah, F. J., Henry, M. A. 2014. Variations of physiological and innate immunological responses in goldfish (*Carassius auratus*) subjected to recurrent acute stress. Fish and Shellfish Immunology 37. Pp 147-153.
 - Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sanchez-Perez, P., Cadenas, S., Lamas, S. 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. Redox Biology 6. Pp 183–197.
 - FAO. 2020. Fisheries and aquaculture resources. *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758).
 - FAO. SOFIA. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome.
 - Fast M. D., Sims D.E., Burka J. F., Mustafa A., Ross N.W. 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. Comparative Biochemistry and Physiology: Part A Molecular and Integrative Physiology 132. Pp 645-657.

- Fayed W. M. A., Khalil, R. H., Sallam, G. R., Mansour, A. T., Elkhayat, B. K., Omar, E. A. 2019. Estimating the effective level of *Yucca schidigera* extract for improvement of the survival, haematological parameters, immunological responses and Water quality of European seabass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports* 15, 100208.
- Fazio, F., Piccione, G., Arfuso, F., Faggio, C. 2015a. Peripheral blood and head kidney haematopoietic tissue response to experimental blood loss in mullet (*Mugil cephalus*). *Marine Biology Research* 11. Pp 197–202.
- Fazio, F., Saoca, C., Casella, S., Forino, G., Piccione, G. 2015b. Relationship between blood parameters and biometric indices of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* cultured in onshore tanks. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48:4. Pp 289-296.
- FEAP. 2020. Federation of European Aquaculture Producers. European Aquaculture Production Report (2014-2019). P 43.
- Ferreira, I. A., Costa, J.Z., Macchia, V., Thompson, K. D., Baptista, T. 2019. Detection of Betanodavirus in experimentally infected European seabass (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus 1758) using non-lethal sampling methods. *Journal of Fish Diseases*. Pp 1097-1104.
- Fridovich, I. 1995 Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review Biochemistry* 64. Pp 97–112.
- Fu, Z., Qin, J. Q., Ma, Z., Yu, G. 2021. Acute acidification stress weakens the head kidney immune function of juvenile *Lates calcarifer*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 225. 112712.
- Geven, E. J. W., Klaren, P. H. M. 2017. The teleost head kidney: integrating thyroid and immune signaling. *Developmental and Comparative Immunology* 66. Pp 73–83.
- Gjessing, M.C., Kvellestad, A., Ottesen, K., Falk, K. 2009. Nodavirus provokes subclinical encephalitis and retinochoroiditis in adult farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases* 32. Pp 421–431.
- Glazebrook, J.S., Campbell, R.S.F. 1987. Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: A review. In *Management of Wild and Cultured Sea Bass/Barramundi (Lates calcarifer)*, Proceedings of an international workshopm Darwin, N.T. Australia; Coppland, J.W., Grey, D.L., Eds.; Australian Centre for International Agruculture Research (ACIAR): Camberra, Australia. Pp. 204–206.
- Glazebrook, J.S., Heasman, M.P., Beer, S.W. 1990. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases* 13. Pp 245–249.
- Gomez, D.K., Lim, D.J., Baeck, G.W., Youn, H.J., Shin, N.S., Youn, H.Y., Hwang, C.Y., Park, J.H., Park, S.C. 2006. Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *Journal of Veterinary Science* 7. Pp 369–374.
- Gomez, D.K., Okinaka, Y., Nakai, T., Sato, J., Mushiake, K., Isshiki, T. 2004. PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *Journal of Fish Diseases* 27. Pp 603–608.
- González-Fernández, C., Esteban, M. A., Cuesta, A. 2021. Molecular characterization of the T cell costimulatory receptors CD28 and CTLA4 in the European sea bass. *Fish and Shellfish Immunology* 109. Pp 106-115.
- Gonzalez-Silvera, D., Guardiola, F.A., Espinosa, C., Chaves-Pozo, E., Esteban, M.Á., Cuesta, A. 2019. Recombinant nodavirus vaccine produced in bacteria and

- administered without purification elicits humoral immunity and protects European sea bass against infection. *Fish and Shellfish Immunology* 88. Pp 458–463.
- Grant, K.R. 2015. Fish hematology and associated disorders. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 18. Pp 83–103.
 - Grotmol, S., Bergh, Ø., Totland, G.K. 1999. Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: Occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 36. Pp 95–106.
 - Grotmol, S., Totland, G.K., Kvellestad, A., Fjell, K., Olsen, A.B. 1995. Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous system and retina. *Bull. European Association of Fish Pathologists* 15. Pp 176–180.
 - Grotmol, S., Totland, G.K., Thorud, K., Hjeltnes, B.K. 1997. Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: A probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29. Pp 85–97.
 - Grove, S., Johansen, R., Reitan, L. J., Press, C. M., Dannevig, B. H. 2006. Quantitative investigation of antigen and immune response in nervous and lymphoid tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) challenged with nodavirus. *Fish and Shellfish Immunology* 21. Pp 525–539.
 - Guardiola F.A., Cuesta A., Arizcun M., Meseguer J., Esteban, M.A. 2014. Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish and Shellfish Immunology* 36. Pp 45-51.
 - Guo, C.J., He, J., He, J.G. 2019. The immune evasion strategies of fish viruses. *Fish and Shellfish Immunology* 86. Pp 772-784.
 - Güroy, B., Mantoglu, S., Kayal, S., Sahin, I. 2014. Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on growth, total ammonia-nitrogen excretion and hematological parameters of juvenile striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture Research* 45. Pp 647–654.
 - Hata, N., Okinaka, Y., Iwamoto, T., Kawato, Y., Mori, K.I., Nakai, T. 2010. Identification of RNA regions that determine temperature sensitivities in betanodaviruses. *Archives of Virology* 155. Pp 1597–1606.
 - Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.-S. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317. Pp 1-15.
 - Huang, Y.C., Han, Y. S. 2014. Determining anti-betanodavirus compounds through a GF-1 cell-based screening platform. *Antiviral Research* 105. Pp 47-53.
 - Huang, Y.C., Lin, T.S., Peng, C., Chan, N.L., Han, Y.S. 2015. Strong inhibition of betanodavirus replication by ribavirin targeting RNA-dependent RNA polymerase, *Journal of Fish. Diseases* 39. Pp 619-623.
 - Hussein, M. N. A., Cao, X. 2018. Brain anatomy and Histology in Teleosts (Review Article). *Benha Veterinary Medical Journal*, Vol. 35, No. 2. Pp 446-463.
 - Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dis-mutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54. Pp 287–293.

- Ikenaga, T., Tatecho, Y., Nakai, T., Uematsu, K. 2002. Betanodavirus as a novel transneuronal tracer for fish. *Neuroscience Letters* 331. Pp 55–59.
- Ito, Y., Okinaka, Y., Mori, K-I., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., Nakai, T. 2008. Variable region of betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Diseases of Aquatic Organisms*, Vol. 79. Pp 199-205.
- Ivanova, V., Rouseva, R., Kolarova, M., Serkedjieva, J., Rachev, R., Manolova N. 1994. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 24. Pp 83-97.
- Iwama, G.K., Pickering, A., Sumpter, J., Schreck, C. 2011. *Fish Stress and Health in Aquaculture*.
- Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K-I., Arimoto, M., Okuno, T., Nakai, T. 2004. Identification of Host-Specificity Determinants in Betanodaviruses by Using Reassortants between Striped Jack Nervous Necrosis Virus and Sevenband Grouper Nervous Necrosis Virus. *Journal of Virology*, Vol. 58, No. 3. Pp 1256-1262.
- Jahan, A., Nipa, T. T., Islam, S. M. M., Uddin, M. H., Islam, M. S., Shahjahan, M. 2019. Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) could be suitable for coastal aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*.
- Jaramillo, D., Hick, P., Deece, K., Tweedie, A., Kirkland, P., Arzey, E. 2016. Comparison of ELISA formats for detection of antibodies specific for nervous necrosis virus (Betanodavirus) in the serum of immunized barramundi *Lates calcarifer* and Australian bass *Macquaria novemaculeata*. *Aquaculture* 451. Pp 33–38.
- Jassim, S.A., Naji, M.A. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective, *Journal of Applied Microbiology* 95. Pp 412–427.
- Jawad, L. A., Al-Mukhtar, M. A., Ahmed, H. K. 2004. The relationship between haematocrit and some biological parameters of the Indian shad, *Tenualosa ilisha* (family Clupeidae). *Animal Biodiversity Conservation* 31. Pp 47-52.
- Jia, R., Cao, L., Du, J., Xu, P., Jeney, G., Yin, G. 2013. The protective effect of silymarin on the carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in common carp (*Cyprinus carpio*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 49. Pp 155–161.
- Jia, R., Liu, B-L., Feng, W-R., Han, C., Huang, B., Lei, J-L. 2016. Stress and immune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. *Fish and Shellfish Immunology* 55. Pp 131-139.
- Johansen R., Sommerset I., Tørud B., Korsnes K., Hjortaas M. J., Nilsen F., Nerland A. H., Dannevig B. H. 2004. Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 27. Pp 591–601.
- Junirahma, N. S., Yanuhar, U. 2020. Immune Response of VNN (Viral Nervous Necrosis) Infected Grouper Utilizing *Chlorella vulgaris* Extract as an Anti-Virus Candidate. *Journal of Physics: Conference Series* 1665. Pp 1-5.
- Kai, Y.H., Su, H.M., Tai, K.T., Chi, S.C. 2010. Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccine* 28. Pp 996–1001.
- Kaplow, L.S., Ladd, C. 1965. Brief report: simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blood* 26 (2). Pp 215–219.
- Khazeni, N., Bravata, D. M., Holty, J. E., Uyeki, T. M., Stave, C. D., Gould, M. K. 2009. Systematic review: safety and efficacy of extended duration antiviral

- chemoprophylaxis against pandemic and seasonal gripe. *Annals of Internal Medicine* 151 (7). Pp 464-473.
- Khumaidi, A., Fadjar, M., Iranawati, F., Kilawati, Y., Yanuhar, U. 2019. Mass Mortality Associated with Viral Nervous Necrosis of Hybrid Grouper (*Epinephelus* sp.) Cultured in City of Grouper. In Proceedings of the International Conference on Biology and Applied Science (ICOBAS), Malang, Indonesia, 13–14 March. AIP Publishing LLC: Melville, NY, USA, 2019; Volume 2120, p. 070007.
 - Kim, H. J., Yoo, H. S., Kim, J. C., Park, C. S., Choi, M. S., Kim, M. 2009. Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication. *Journal of Ethnopharmacology* 124(2). Pp 189-196.
 - Kim, Y.C., Kwon, W.J., Kim, M.S., Kim, K.I., Min, J.G., Jeong, H.D. 2018. High prevalence of betanodavirus barfin flounder nervous necrosis virus as well as red-spotted grouper nervous necrosis virus genotype in shellfish. *Journal of Fish Diseases* 41. Pp 233–246.
 - Klaywong, K., Khutrakul, G., Choowongkamon, K., Lekcharoensuk, C., Petcharat, N., Leckcharoensuk, P. 2014. Screening for lead compounds and herbal extracts with potential antigripe viral activity. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public* 45(1). Pp 62-74.
 - Korsnes, K., Karlsbakk, E., Nylund, A., Nerland, A.H. 2012. Horizontal transmission of nervous necrosis virus between turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic cod *Gadus morhua* using cohabitation challenge. *Diseases of Aquatic Organisms* 99. Pp 13–21.
 - Krasnov, A., Kileng, Ø., Skugor, S., Jørgensen, S.M., Afanasyev, S., Timmerhaus, G., Sommer, A.I., Jensen, I. 2013. Genomic analysis of the host response to nervous necrosis virus in Atlantic cod (*Gadus morhua*) brain. *Molecular Immunology* 54. Pp 443–452.
 - Kudi, A. C., Myint, S. H. 1999. Antiviral activity of some Nigerian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 68(1–3). Pp 289-294.
 - Labella, A. M., Garcia-Rosado, E., Bandín, I., Dopazo, C. P., Castro, D., Alonso, M. C., Borrego, J. J. 2018. Transcriptomic Profiles of senegalese sole infected With nervous necrosis Virus reassortants Presenting Different Degree of Virulence. *Frontiers in Immunology*, Vol. 9. Pp 1-12.
 - Lawal, T.O., Adeniyi, B.A., Moody, J.O., Mahady, G.B. 2012. Combination studies of *Eucalyptus torelliana* F. Muell. Leaf extracts and Clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research* 26. Pp 1393–1398.
 - Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J., Ollevier, F. 1997. Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases* 20. Pp 145–151.
 - Li, L., Cardoso, J. C. R., Félix, R. C., Mateus, A. P., Canário, A. V. M., Poer, D. M. 2021. Fish lysozyme gene family evolution and divergent function in early development. *Developmental and Comparative Immunology* 114. 103772.
 - Li, P., Yu, Q., Li, F., Qin, X., Dong, D., Chen, B., Qin, Q. 2018. First identification of the nervous necrosis virus isolated from cultured golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in Guangxi, China. *Journal of Fish Diseases* 41. Pp 1177–1180.
 - Liu, B., Jia, R., Han, C., Huang, B., Lei, J-H. 2016. Effects of stocking density on antioxidant status, metabolism and immune response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 190. Pp 1-8.

- Liu, J., Qin, Q., Zhang, X., Li, C., Yu, Y., Huang, X. 2020. Development of a novel lateral flow biosensor combined with aptamer-based isolation: Application for rapid detection of grouper nervous necrosis virus. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Liu, Q., Zhou, Y. H., Yang Z. Q. 2016. The cytokine storm of severe gripe and development of immunomodulatory therapy. *Cellular and Molecular Immunology* 13. Pp 3-10.
- Liu, S-Y., Sanchez, D. J., Cheng, G. 2011. New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon. *Current Opinion in Immunology* 23. Pp 57-64.
- Lopes, C., Malhão, F. 2016. Manual do Curso de técnicas histológicas no âmbito do projeto Aprender a conhecer o ambiente marinho de Portugal BioMar PT.
- Lopez-Jimena, B., Garcia-Rosado, E., Thompson, K. D., Adams, A., Infante, C., Borrego, J. J., Alonso, M. C. 2012. Distribution of red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) antigens in nervous and non-nervous organs of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during the course of an experimental challenge. *Journal of Veterinary Science* 13 (4). Pp 355-362.
- Londero, E. P., Bressan, C. A., Pês, T. S., Saccol, E. M. H., Baldisserotto, B., Finamor, I. A., Pavanato, M. A. 2021. Rutin-added diet protects silver catfish liver against oxytetracycline-induced oxidative stress and apoptosis. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C* 239. 108848.
- Long, L., Zhang, H., Ni, Q., Liu, H., Wu, F., Wang, X. 2019. Effects of stocking density on growth, stress and immune responses of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in a recirculating aquaculture. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. Pp 25-34.
- Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101. Pp 13–30.
- Machado, M., Azeredo, R., Diaz-Rosales, P., Afonso, A., Peres, H., Oliva-Teles, A., Costas, B. 2015. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish and Shellfish Immunology* 42. Pp 353–362.
- Machado, M., Azeredo, R., Fontinha, F., Fernández-Boo, S., Conceição, L. E. C., Dias, J., Costas, B. 2018. Dietary Methionine Improves the European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Immune Status, Inflammatory Response, and Disease Resistance. *Frontiers in Immunology* 9. Pp 1-17.
- Magnoni, L. J., martos-Sitcha, J. A., Queiroz, A., Calduch-Giner, J. A., Gonçalves, J. F. M., Rocha, C. M. R., Abreu, H. T., Schrama, J. W., Ozorio, R. O. A., Pérez-Sánchez, J. 2017. Dietary supplementation of heat-treated Gracilaria and Ulva seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The Company of Biologists* 6.
- Ma, K., Bao, Q., Wu, Y., Chen, S., Zhao, S., Wu, H., Fan, J. 2020. Evaluation of Microalgae as Immunostimulants and Recombinant Vaccines for Diseases Prevention and Control in Aquaculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 8. Pp 1-12.
- Mao, M.-G., Wen, S.-H., Perálvarez-Marín, A., Li, H., Jiang, J.-L., Jiang, Z.-Q., Li, X., Sun, H., Lü, H.-Q. 2015. Evidence for and characterization of nervous necrosis virus infection in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Archives of Virology* 160. Pp 2237–2248.

- Mauray, S., Sternberg, C., Theveniaux, J., Millet, J., Siquin, C., Tapon-Breaudiere, J., Fischer, A. M. 1995. *Thromb. Haemost.*74. Pp 1280–1285.
- Means, N., Elechalawar, C. K., Chen, W. R., Bhattacharya, R., Mukherjee, P. 2021. Revealing macropinocytosis using nanoparticles. *Molecular Aspects of Medicine*.
- Mitter, K., Kotoulas, G., Magoulas, A., Mulero, V., Sepulcre, P., Figueras, A., Novoa, B., Sarropoulou, E. 2009. Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. Pp 340-347.
- Mladineo, I. 2003. The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *Journal of Applied Ichthyology* 19. Pp 366–370.
- Moreno, P., Gmez-Mata, J., Garcia-Rosado, E., Bejar, J., Labella, A. M., Souto, S., Alonso, M. C. 2020. Differential immunogene expression profile of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in response to highly and low virulent NNV. *Fish and Shellfish Immunology* 106. Pp 56-70.
- Moreno, P., Oliveira, J.G., Labella, A., Cutrín, J.M., Baro, J.C., Borrego, J.J., Dopazo, C.P. 2014. Surveillance of viruses in wild fish populations in areas around the Gulf of Cadiz (South Atlantic Iberian Peninsula). *Applied and Environmental Microbiology Journal* 80. Pp 6560–6571.
- Moreno, P., Lopez-Jimena, B., Randelli, E., Scapigliati, G., Bounocore, F., Garcia-Rosado, E., Borrego, J. J., Alonso, M. C. 2018. Immuno-related gene transcription and antibody response in nodavirus (RGNNV and SJNNV)-infected European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish e Shellfish Immunology* 78. Pp 270-278.
- Moreno, P., Souto, S., Leiva-Rebollo, R., Borrego, J. J., Bandín, I., Alonso, M. C. 2019. Capsid amino acids at positions 247 and 270 are involved in the virulence of betanodaviruses to European sea bass. *Scientific Reports* 9:14068.
- Mori, K-I., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K., Furusawa\$, I. 1992. Properties of a New Virus Belonging to Nodaviridae Found in Larval Striped Jack (*Pseudocaranx dentex*) with Nervous Necrosis. *Virology* 187. Pp 368-371.
- Munday, B.L., Kwang, J., Moody, N. 2002. Review article Betanodavirus infections of teleost fish: A review. *Journal of Fish Diseases* 25. Pp 127–142.
- Nardocci, G., Navarro, C., Cortffes, P.P., Imarai, M., Montoya, M., Valenzuela, B. 2014. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish, *Fish and Shellfish Immunology* 40. Pp 531-538.
- NaveenKumar, S., Hassan, M.A., Mahmoud, M.A., Al-Ansari, A., Al-Shwared, W.K. 2017. Betanodavirus infection in reared marine fishes along the Arabian Gulf. *Aquaculture International* 25. Pp 1543–1554.
- Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 29. Pp 2-14.
- Neelima, P., Sunitha, K., Gopala Rao, N., Chandra Sekhara Rao, J. 2015. Haematological alterations in *Cyprinus carpio* as biomarker of Cypermethrin toxicity. *International Journal of Current Research* 7 (8). Pp 18864–18870.
- Niedbalski, W., Fitzner, A. 2018. Impact of climate change on the occurrence and distribution of bluetongue in Europe. *Medycyna Weterynaryjna* 74. Pp 634–639.

- Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Bu, Y., Ren, Y., Zhang, M., Song, Z., Ding, H., 2014. The physiological performance and immune responses of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) to stocking density and hypoxia stress. *Fish and Shellfish Immunology* 36. Pp 325–335.
- Nishino, T., Nagumo, T., Kiyohara, H., Yamada, H. 1991. *Carbohydrate Research* 211. Pp 77–90.
- Nishizawa T., Furuhashi M., Nagai T., Nakai T., Muroga K. 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied Environmental Microbiology Journal* 63. Pp 1633–1636.
- Nishizawa, T., Mori, K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, Vol. 18. Pp 103–107.
- Nishizawa, T., Mori, K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I., Muroga, K. 1995. Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *Journal of General Virology*. 76. Pp 1563–1569.
- Nishizawa, T., Muroga, K., Arimoto, M. 1996. Failure of the Polymerase Chain Reaction (PCR) Method to Detect Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) in Striped Jack *Pseudocaranx dentex* Selected as Spawners. *Journal of Aquatic Animal Health* 8. Pp 332–334.
- Ng, W. F., To, K. F. 2007. Pathology of human H5N1 infection: new findings. *Lancet* 370(9593). Pp 1106–1108.
- Nguyen, H.D., Nakai, T., Muroga, K. 1996. Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 24. Pp 99–105.
- Nguyen, H.D., Mushiake, K., Nakai, T., Muroga, K. 1997. Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Diseases of Aquatic Organisms* 28. Pp 87–91.
- Nuñez-Ortiz, N., Pascoli, F., Picchiatti, S., Buonocore, F., Bernini, C., Toson, M., Scapigliati, G., Toffan, A. 2016. A formalin-inactivated immunogen against viral encephalopathy and retinopathy (VER) disease in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Immunological and protection effects. *Veterinary Research* 47.
- Okomoda, V.T., Ataguba, G.A., Ayuba, V.O. 2013. Hematological response of *Clarias gariepinus* fingerlings exposed to acute concentrations of Sunsate®. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 9.
- Oldstone, M. B. A., Rosen, H. 2014. Cytokine Storm Plays a Direct Role in the Morbidity and Mortality from Gripe Virus Infection and is Chemically Treatable with a Single Sphingosine-1-Phosphate Agonist Molecule, in: M.B.A. Oldstone, H. Rosen (Eds.), *Sphingosine-1-Phosphate*. Signal. Immunol. Infect. Dis., Springer International Publishing, Cham. Pp. 129–147.
- Olveira, J.G., Soares, F., Engrola, S., Dopazo, C.P., Bandín, I. 2008. Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20. Pp 215–219.
- Orhan, I., Deliorman-Orhan, D., özçelik, B. 2009. Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. *Food Chemistry* 115. Pp 701–705.

- Osbourn, A.E., Lanzotti, V. 2009. Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application, Springer Science + Business Media LLC., Philadelphia, USA.
- Özcelik, B., Aslan, M., Orhan, I., Karaoglu, T. 2005a. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of the lipophilic extracts of *Pistacia vera*. Microbiological Research, 160. Pp 159–164.
- Painter, T. J. 1983. Algal polysaccharides. In *The Polysaccharides*; Aspinall, G. O., Ed.; Academic Press: London, Vol. 2. Pp 195–285.
- Pakingking, R., Bautista, N.B., de Jesus-Ayson, E.G., Reyes, O. 2010. Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. Fish and Shellfish Immunology 28. Pp 525–533.
- Palaksha K.J., Shin G.W., Kim Y.R., Jung T.S. 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology 24. Pp 479-488.
- Panzarin, V., Cappelozza, E., Mancin, M., Milani, A., Toffan, A., Terregino, C., Cattoli, G. 2014. In vitro study of the replication capacity of the RGNNV and the SJNNV betanodavirus genotypes and their natural reassortants in response to temperature. Veterinary Research 45. Pp 1–11.
- Panzarin, V., Fusaro, A., Monne, I., Cappelozza, E., Patarnello, P., Bovo, G., Capua, I., Holmes, E.C., Cattoli, G. 2012. Molecular epidemiology and evolutionary dynamics of betanodavirus in southern Europe. Infection, Genetics and Evolution 12. Pp 63–70.
- Panzarin, V., Patarnello, P., Mori, A., Rampazzo, E., Cappelozza, E., Bovo, G., Cattoli, G. 2010. Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. Archives of Virology 155. Pp 1193–1203.
- Passos, R., Correia, A. P., Carmo, B., Santos, P., Simões, M., Afonso, C., Baptista, T. 2021. Effect on health status and pathogen resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with diets supplemented with *Gracilaria gracilis*. Aquaculture 531, 735888.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research 29(9).
- Péducasse, S., Castric, J., Thiéry, R., Je_roy, J., Le Ven, A., Baudin Laurencin, F. 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. Diseases of Aquatic Organisms 36. Pp 11–20.
- Percival, E.; McDowell, R. H. 1967. *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*; Academic Press: New York. Pp 157–175.
- Peixoto, M. J., Salas- Leitón, E., Brito, F., Pereira, L. F., Svendsen, J. C., Baptista, T., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P. A., Gonçalves, J. F. M., Ozório, R. O. A. 2017. Effects of dietary *Gracilaria* sp. and *Alaria* sp. Supplementation on growth performance, metabolic rates and health in meagre (*Argyrosomus regius*) subjected to pathogen infection. Journal of Applied Phycology 29. Pp 433-447.
- Peixoto, M. J., Salas- Leitón, E., Pereira, L. F., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P. A., Gonçalves, J. F. M., Ozório, R. O. A. 2016. Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive

- capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports* 3. Pp 189-197.
- Pês, T. S., Saccol, E. M. H., Londero, E. P., Bressan, C. A., Ourique, G. M., Rizzetti, T. M., prestes, O. M., Zanella, R., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A. 2018. Protective effect of quercetin against oxidative stress induced by oxytetracycline in muscle of silver catfish. *Aquaculture* 484. Pp 120-125.
 - Plant, K.P., LaPatra, S.E. 2011. Advances in fish vaccine delivery, *Developmental and Comparative Immunology* 35. Pp 1256-1262.
 - Poisa-Beiro, L., Dios, S., Montes, A., Aranguren, R., Figueras, A., Novoa, B. 2008. Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain. *Molecular Immunology* 45. Pp 218-225.
 - Ponce, N. M.A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Flores, M. L., Stortz, C. A. 2003. Fucoidans from the Brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research* 338. Pp 153-165.
 - Pringproa, K., Khonghiran, O., Kunanoppadol, S., Potha, T., Chuammitri, P. 2014. In vitro virucidal and virustatic properties of the crude extract of *Cynodon dactylon* against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Medicine International* 947589.
 - Pujol, C. A., Scolaro, L. A., Ciancia, M., Matulewicz, M. C., Cerezo, A. S., Damonte, E. B. 2006. Antiviral activity of a carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against intraperitoneal murine herpes simplex virus infection. *PlantaMedica* 72. Pp 121–125.
 - Quade, M.J., Roth, J.A. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58 (3–4). Pp 239–248.
 - Ransangan, J., Manin, B.O. 2010. Mass mortality of hatchery-produced larvae of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch), associated with viral nervous necrosis in Sabah, Malaysia. *Veterinary Microbiology*. 145. Pp 153–157.
 - Ransangan, J., Manin, B.O. 2012. Genome analysis of Betanodavirus from cultured marine fish species in Malaysia. *Veterinary Microbiology* 156. Pp 16–44.
 - Rothenburg, S., Deigendesch, N., Dey, M., Dever, T. E., Tazi, L. 2008. Double-stranded RNA-activated protein kinase PKR of fishes and amphibians: Varying the number of double-stranded RNA binding domains and lineage-specific duplications. *BMC Biology*, 6:12.
 - Rouxel, R.N., Tafalla, C., Mérour, E., Leal, E., Biacchesi, S., Brémont, M. 2016. Attenuated infectious hematopoietic necrosis virus with rearranged gene order as potential vaccine. *Journal of Virology* 90. Pp 10857–10866.
 - Sahin, K., Yazlak, H., Orhan, C., Tuzcu, M., Akdemir, F., Sahin, N. 2014. The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. *Aquaculture* 418. Pp 132–138.
 - Sakamoto, T., Okinaka, Y., Mori, K.-I., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., Yamashita, H., Nakai, T. 2008. Phylogenetic analysis of betanodavirus RNA2 identified from wild marine fish in oceanic regions. *Fish Pathology* 43. Pp 9–27.
 - Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56. Pp 295-301.

- Seeram, N. P. 2006. Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54. Pp 1599–1603.
- Seo, B. J., Rather, I. A., Kumar, V. J. R., Choi, U. H., Moon, M. R., Lim, J. H., Park, Y. H. 2012. Evaluation of *Leuconostoc mesenteroides* YML003 as a probiotic against low-pathogenic avian gripe (H9N2) virus in chickens. *Journal of Applied Microbiology* 113. Pp 163–171.
- Sharma, S., Shah, E., Davla, D., Dixit, G., Patel, A., Kumar, A. K. 2019. Effect of microalga-based diet on oxidative stress enzymes of African catfish, *Clarias gariepinus*. *International Aquatic Research* 11. Pp 377-387.
- Skliris G. P., Krontiris J. V., Sideris D. C., Shinn A. P., Starkey W. G., Richard R. H. 2001. Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Research* 75. Pp 59–67.
- Skliris, G.P., Richards, R.H. 1999. Induction of nodavirus disease in seabass, *Dicentrarchus labrax*, using different infection models. *Virus Research* 63. Pp 85–93.
- Sommerset, I., Lorenzen, E., Lorenzen, N., Bleie, H., Nerland, A.H. 2003. A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine* 21. Pp 4661–4667.
- Song, L., Chen, X., Liu, X., Zhang, F., Hu, L., Yue, Y. 2016. Characterization and comparison of the structural features, immune-modulatory and anti-avian gripe virus activities conferred by three algal sulfated polysaccharides. *Marine Drugs*, 14. Pp 4–20.
- Sood, R., Swarup, D., Bhatia, S., Kulkarni, D. D., Dey, S., Saini, M. 2012. Antiviral activity of crude extracts of *Eugenia jambolana* Lam. against highly pathogenic avian gripe (H5N1) virus. *Indian Journal of Experimental Biology* 50(3). Pp 179-186.
- Sookkongwaree, K., Geitmann, M., Roengsumran, S., Petsom, A., Danielson, U. H. 2006. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia Parviflora*. *The Pharmaceutical Journal* 61(8). Pp 717-721.
- Souto, S., Mérour, E., Biacchesi, S., Brémont, M., Olveira, J. G., Bandín, I. 2015a. In vitro and in vivo characterization of molecular determinants of virulence in reassortant betanodavirus. *Journal of General Virology* 96. Pp 1287-1296.
- Souto, S., Olveira, J.G., Alonso, M.C., Dopazo, C.P., Bandín, I. 2018c. Betanodavirus infection in bath-challenged *Solea senegalensis* juveniles: A comparative analysis of RGNNV, SJNNV and reassortant strains. *J. Fish Dis.* 41. Pp 1571–1578.
- Souto, S., Olveira, J.G., Bandín, I. 2015b. Influence of temperature on Betanodavirus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Veterinary Microbiology* 179. Pp 162–167.
- Souto, S., Olveira, J. G., Dopazo, C. P., Borrego, J. J., Bandín, I., (2018b). Modification of betanodavirus virulence by substitutions in the 3' terminal region of RNA2. *Journal of General Virology* 99. Pp 1210-1220.
- Souto, S., Olveira, J. G., Vázquez-Salgado, L., Dopazo, C. P., Bandín, I., (2018a). Betanodavirus infection in primary neuron cultures from sole. *Veterinary Research* 49:86. Pp 1-8.
- Subramanian S., MacKinnon S., Ross N. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative*

Biochemistry Physiology: Part B Biochemical and Molecular Biology 148. Pp 56-63.

- Tanaka, S., Takagi, M., Miyazaki, T. 2004. Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage. *Journal of Fish Diseases* 27. Pp 385–399.
- Thiéry, R., Arnould, C., Delsert, C. 1999. Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *Journal of Fish Diseases* 22. Pp 201–207.
- Toffan, A., Panzarin, V., Toson, M., Cecchetti, K., Pascoli, F. 2016. Water temperature effects pathogenicity of different betanodavirus genotypes in experimentally challenged *Dicentrarchus labrax*. *Diseases of Aquatic Organisms* 119. Pp 231–238.
- Toubanaki, D.K., Margaroni, M., Karagouni, E. 2015. Development of a novel allele-specific PCR method for rapid assessment of nervous necrosis virus genotypes. *Current Microbiology* 71. Pp 529–539.
- Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 35. Pp 1366-1375.
- Tort, L., Balasch, J. C., Mackenzie, S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunología*, Vol. 22, No. 3. Pp 277-286.
- Totland, G.K., Grotmol, S., Morita, Y., Nishioka, T., Nakai, T. 1999. Pathogenicity of nodavirus strains from striped jack *Pseudocaranx dentex* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, studied by waterborne challenge of yolk-sac larvae of both teleost species. *Diseases of Aquatic Organisms* 38. Pp 169–175.
- Vaillant and Qurie, 2020: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499840/>
- Vandeputte, M., Gagnaire, P.A., Allal, F. 2019. The European sea bass: a key marine fish model in the wild and in aquaculture *Animal Genetics* 50. Pp 195-206.
- Valero, Y., Arizcun, M., Esteban, M.Á., Bandín, I., Oliveira, J.G., Patel, S., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E. 2015a. Nodavirus colonizes and replicates in the testis of gilthead seabream and European sea bass modulating its immune and reproductive functions. *PLoS ONE*, 10. Pp 1–24.
- Valero, Y., Awad, E., Bounocore, F., Arizcun, M., Esteban, M. Á., Meseguer, J., Chaves-Pozo, E., Cuesta, A. 2016. An oral chitosan DNA vaccine against nodavirus improves transcription of cell-mediated cytotoxicity and interferon genes in the European sea bass juveniles gut and survival upon infection. *Developmental and Comparative Immunology* 65. Pp 64-72.
- Valero, Y., Morcillo, P., Meseguer, J., Bounocore, F., Esteban, M. A., Chaves-Pozo, E., Cuesta, A. 2015b. Characterization of the IFN pathway in the teleost fish gonad against vertically transmitted viral nervous necrosis virus. *Journal of General Virology* 96. Pp 2176-2187.
- Valero, Y., Mokrani, D., Chaves-Pozo, E., Arizcun, M., Oumouna, M., Meseguer, J., Esteban, M. A., Cuesta, A. 2018. Vaccination with UV-inactivated nodavirus partly protects European sea bass against infection, while inducing few changes in immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 86. Pp 171-179.
- Vendramin, N., Toffan, A., Mancin, M., Cappelozza, E., Panzarin, V., Bovo, G., Cattoli, G., Capua, I., Terregino, C. 2014. Comparative pathogenicity study of ten different betanodavirus strains in experimental infected European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases* 37. Pp 371–383.

- Verrier, E. R., Langevin, C., Benmansour, A., Boudinot, P. 2011. Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 35. Pp 1204-1214.
- Venkateswaran, P. S., Millman, I., Blumberg, B. S. 1989. *Planta Med.* 55. Pp 265–270.
- Vimal, S., Farook, M.A., Madan, N., Abdul Majeed, S., Nambi, K.S.N., Taju, G., Sundar raj, N., Venu, S., Subburaj, R., Thirunavukkarasu, A.R. 2016. Development, distribution and expression of a DNA vaccine against nodavirus in Asian Seabass, *Lates calcarifier* (Bloch, 1790). *Aquaculture Research* 47. Pp 1209–1220.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Diniz, M. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological indicators* 23. Pp 274-279.
- Volpe, E., Gustineli, A., Caffara, M., Errani, F., Quaglio, F., Fioravanti, M. L., Giulli, S. 2020. Viral nervous necrosis outbreaks caused by the RGNNV/SJNNV reassortant betanodavirus in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquacultura* 523: 735155.
- Wang, Y.D., Rajanbabu, V., Chen, J.Y. 2015. Transcriptome analysis of medaka following epinecidin-1 and TH1-5 treatment of NNV infection. *Fish and Shellfish Immunology* 42. Pp 121-131.
- Warr, G.W. 1995. The immunoglobulin genes of fish. *Developmental and Comparative Immunology* 19. Pp 1–12.
- Waziri, H.M.A. 2015. Plants as antiviral agents. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 6. P 254.
- Whyte, S.K. 2007. The innate immune response of finfish: a review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology* 23. Pp 1127-1151.
- Wiart, C., Kumar, K., Yusof, M. Y., Hamimah, H., Fauzi, Z. M., Sulaiman, M. 2005. Antiviral properties of ent-labdene diterpenes of *Andrographis paniculata* Nees, inhibitors of herpes simplex virus type 1. *Phytotherapy Research* 19(12). Pp 1069-1070.
- Wijesekara, I., Pangestutia, R., Kim, S. K. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, 84. Pp 14–21.
- Wu, Y., Zhou, Y., Cao, Z., Sun, Y., Chen, Y., Xiang, Y., Wang, L., Zhang, S., Guo, W. 2019. Comparative analysis of the expression patterns of IL-1 β , IL-11, and IL-34 in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) following different pathogens challenge. *Fish and Shellfish Immunology* 93. Pp 863–870.
- Xiao, Y., Yu, L., Gui, G., Gong, Y., Wen, X., Xia, W., Yang, H., Zhang, L. 2019. Molecular Cloning and Expression Analysis of Interleukin-8 and -10 in Yellow Catfish and in Responses to Bacterial Pathogen Infection. *BioMed Research International*, Hindawi.
- Yaacob, E. N., De Geest, B. G., Goethals, J., Bajek, A., Dierckens, K., Bossier, P., Vanrompay, D. 2018. Recombinant ferritin-H induces immunosuppression in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) rather than immunostimulation and protection against a *Vibrio anguillarum* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 204. Pp 19-27.

- Yaacob, E. N., Norouzitallab, P., De Geest, B. G., Bajek, A., Dierckens, K., Bossier, P., Vanrompay, D. 2020. Recombinant DnaK Orally Administered Protects Axenic European Sea Bass Against Vibriosis. *Frontiers in Immunology* 10. Pp 1-11.
- Yamashita, H., Mori, K., Kuroda, A., Nakai, T. 2009. Neutralizing antibody levels for protection against betanodavirus infection in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), immunized with an inactivated virus vaccine. *Journal of Fish Diseases* 32. Pp 767–775.
- Yang, Z., Yue, G. H., Wong, S-M. 2021. VNN disease and status of breeding for resistance to NNV in aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*. Pp 1-8.
- Yano T. 1997. The nonspecific immune system: humoral defense. In: Iwama G, Nakanishi T, Hoar W, Randall D, editors. *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*.
- Yarahmadi, P., Miandare, H.K., Fayaz, S., Caipang, C.M.A. 2016. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 48. Pp 43–53.
- Yu, Y., Wang, D., Abula, S., Hu, Y., Zhao, X., Huang, Y. 2013. The immunological adjuvant activity of gypenosides liposome against Newcastle disease vaccine. *International Journal of Biological Macromolecules* 60. Pp 116-121.
- Zhang, Y-B., Gui, J-F. 2012. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 38. Pp 193-202.
- Zhang, J., Zhang, Y-B., Wu, M., Wang, B., Chen, C., Gui, J-F. 2014. Fish MAVS is involved in RLR pathway-mediated IFN response. *Fish and Shellfish Immunology* 41. Pp 222-230.
- Zhou, Q., Zhang, J., Huang, R., Huang, S., Wu, Y., Huang, Y., He, J., Xie, J. 2019. An affinity peptide exerts antiviral activity by strongly binding nervous necrosis virus to block viral entry. *Fish and Shellfish Immunology* 86. Pp 465-473.
- Zhuang, C., Itoh, H., Mizuno, T., Ito, H. 1995. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59. Pp 563–567.
- Zorriehzahra, M. J. 2020. Viral Nervous Necrosis Disease. Chapter 30. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*.
- Zou, J., Secombes, C. J. 2016. Review: The Function of Fish Cytokines. *Biology* 5:23.

Página deixada intencionalmente em branco

Anexos

Tabela I: Lista de genes, temperatura de *annealing* (°C), *amplicon length* (bp), eficiência (%) e sequência dos primers (*forward* e *reverse*) para a expressão de genes.

Grupo funcional	Gene	Acrônimo	Temperatura de Annealing (°C)	Amplicon length (bp)	Eficiência (%)	Primers Sequência Forward (5'–3') Sequência Reverse (5'–3')	Referência
Imunidade inata	<i>Type I IFN</i>	<i>ifn</i>	60	1047	96	F: GGCTCTACTGGATACGATGGC R: CTCCCATGATGCAGAGCTGTG	Valero <i>et al.</i> , 2015b
	<i>IFN regulatory factor 3</i>	<i>irf3</i>	60	465	112	F: AGAGGTGAGTGGCAATGGTC R: GAGCAGTTTGAAGCCTTTGG	Valero <i>et al.</i> , 2015b
	<i>IFN regulatory factor 7</i>	<i>irf7</i>	60	433	99	F: ATTCACCAACCGCATCCTTA R: GCCTCCAGGCATAGATACCA	Valero <i>et al.</i> , 2015b
	<i>Toll-like receptor, pathogen recognition</i>	<i>tlr9</i>	62	100	101	F: TCTTGGTTTGCCGACTTCTTGCGT R: TACTGTTGCCCTGTTGGGACTCTGG	Byadgi <i>et al.</i> , 2019
	<i>Toll-like receptor, pathogen recognition</i>	<i>tlr5m</i>	58	3035	53*	F: GGTCATCTTCAGCGGGATTGT R: GAAGACTGTGCATCGTCTC	Yaacob <i>et al.</i> , 2018; Yacoob <i>et al.</i> , 2020
	<i>TNF receptor/associated factor 3</i>	<i>traf3</i>	60	595	95	F: CGATTAGCCGACATGGATCT R: TGCTTCCTGTTTCCGTCTCT	Valero <i>et al.</i> , 2015b
	<i>dsRNA dependent protein kinase receptor</i>	<i>pkr</i>	60	304	90	F: AGGGTCAGAGCATCAAGGAA R: GACACCTTGCTGTCCCAGTC	Valero <i>et al.</i> , 2015b
	<i>Mitochondrial antiviral signalling protein</i>	<i>mavs</i>	60	586	83*	F: GCACAAGCTCAAAGCATCAA R: TCACTGGAGGGGGTGTTTAC	Valero <i>et al.</i> , 2015b

Referência	<i>Elongation factor 1α</i>	<i>ef1a</i>	60	786	84*	F: CGTTGGCTTCAACATCAAGA R: GAAGTTGTCTGCTCCCTTGG	Valero <i>et al.</i> , 2015a; Valero <i>et al.</i> , 2015b
	β -actin	<i>actb</i>	62	1841	93	F: TGAACCCCAAAGCCAACAGGGAGA R:GTACGACCAGAGGCATACAGGGACA	Mitter <i>et al.</i> , 2009; Byadgi <i>et al.</i> , 2019
	<i>Ribosomal protein L13a</i>	<i>l13a</i>	57	370	88*	F: TCTGGAGGACTGTCAGGGGCATGC R: AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	Mitter <i>et al.</i> , 2009; Byadgi <i>et al.</i> , 2019
Stress	<i>Heat shock protein</i>	<i>hsp90</i>	55	112	103	F:GCTGACAAGAACGACAAGGCTGTGA R: AGATGCGGTTGGAGTGGGTCTGT	Antonopoulou <i>et al.</i> , 2013; Byadgi <i>et al.</i> , 2019
Imunidade adaptativa	<i>Immunoglobulin mu heavy chain</i>	<i>ighm</i>	60	425	98	F: AGGACAGGACTGCTGCTGTT R: CACCTGCTGTCTGCTGTTGT	Valero <i>et al.</i> , 2016; Gonzalez-Silvera <i>et al.</i> , 2019
	<i>Immunoglobulin tau heavy chain</i>	<i>ight</i>	60	679	93	F: TCACTTGGCAAATTGATGGA R: AGAACAGCGCACTTTGTTGA	Valero <i>et al.</i> , 2016; Gonzalez-Silvera <i>et al.</i> , 2019
Imunidade inata	<i>Interleukin 1 β</i>	<i>il-1β</i>	57	105	115	F: AGCGACATGGTGCGATTTCT R: CTCCTCTGCTGTGCTGATGT	Machado <i>et al.</i> , 2018
	<i>Interleukin 8</i>	<i>il-8</i>	55	140	117	F:CGCTGCATCCAAACAGAGAGCAAAC R: TCGGGGTCCAGGCAAACCTCTT	Machado <i>et al.</i> , 2018
	<i>Interleukin 6</i>	<i>Il-6</i>	55	81	103	F: AGGCACAGAGAACACGTCAAA R: AAAAGGGTCAGGGCTGTCTG	Machado <i>et al.</i> , 2018
	<i>Interleukin 10</i>	<i>il-10</i>	55	164	108	F: ACCCCGTTTCGCTTGCCA R: CATCTGGTGACATCACTC	Machado <i>et al.</i> , 2018

*Valor muito baixo de eficiência, logo não foi utilizado.

Tabela II: Concentração de RNA (ng/μL), pesos (mg) respetivos rácios 260/280nm e 260/230nm para expressão de genes.

Tratamento	Identificação das amostras	Pesos (mg)	Concentração (ng/μL)	Rácio 260/280nm	Rácio 260/230nm
Controlo	13.1	38,4	399,4	2,14	2,38
	13.2	12	182,2	2,12	2,26
	14.1	30,2	271,45	2,13	2,31
	14.2	304	383,0	2,09	2,08
	15.1	28,5	356,55	2,12	2,36
	15.2	28,7	464,55	2,13	2,33
Extrato 469 (12mg/kg)	1.1	21,3	266,7	2,11	2,3
	1.2	9,3	175,25	2,11	2,25
	2.1	13,5	74,1	2,09	2,02
	2.2	22	307,6	2,11	2,37
	3.1	23,8	306,65	2,1	2,28
	3.2	30,3	223,3	2,1	2,19
Extrato 469 (6mg/kg)	4.1	27,8	398,75	2,11	2,26
	4.2	28,5	237,4	2,09	2,27
	5.1	12,2	94,55	2,07	2,16
	5.2	18,8	193,4	2,03	1,87
	6.1	18,9	162,95	2,03	1,77
	6.2	36,6	260,7	2,09	2,29
Extrato 558 (306mg/kg)	7.1	17,6	71,85	2,09	2,2
	7.2	13,4	115,3	2,1	2,3
	8.1	27,1	283,4	2,1	2,31
	8.2	40,1	388,95	2,11	2,36
	9.1	33,4	184,45	2,11	2,34

	9.2	28	288,3	2,1	2,15
Extrato 558 (153mg/kg)	10.1	28,8	516,6	2,1	2,32
	10.2	32,8	259,1	2,08	2,1
	11.1	11,6	153,15	2,03	1,84
	11.2	11,6	110,85	2,09	2,18
	12.1	16,3	127,6	2,07	2,01
	12.2	34	458,5	2,1	2,37
Extrato 488 (2000mg/kg)	16.1	28,8	725,40	2,1	2,37
	16.2	46,3	721,15	2,09	2,36
	17.1	43,5	604,1	2,1	2,38
	17.2	6,4	92,5	1,86	1,17
	18.1	41,4	513,65	2,08	2,19
	18.2	31	562,85	2,1	2,35

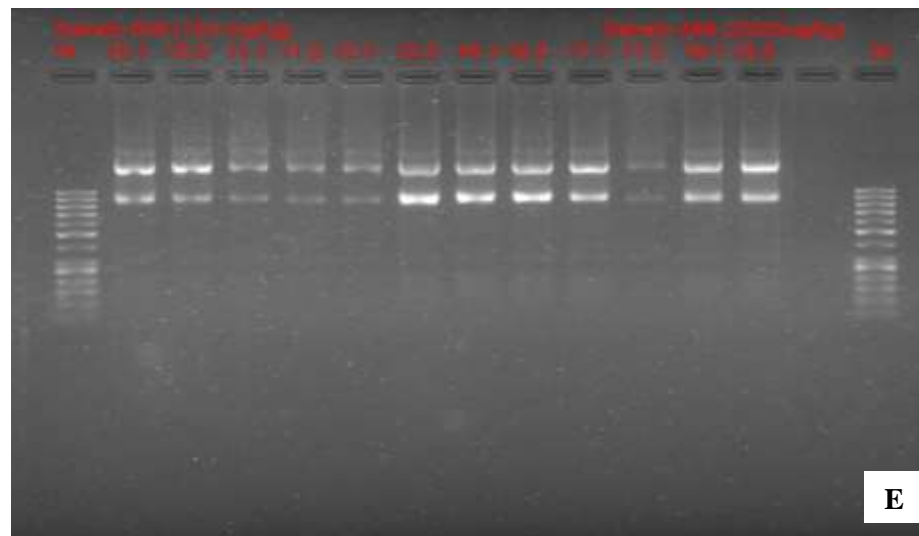
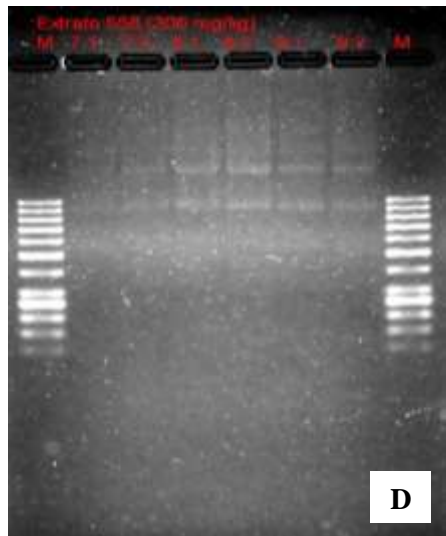
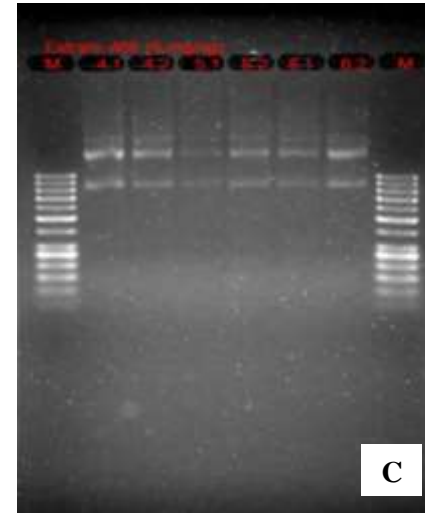
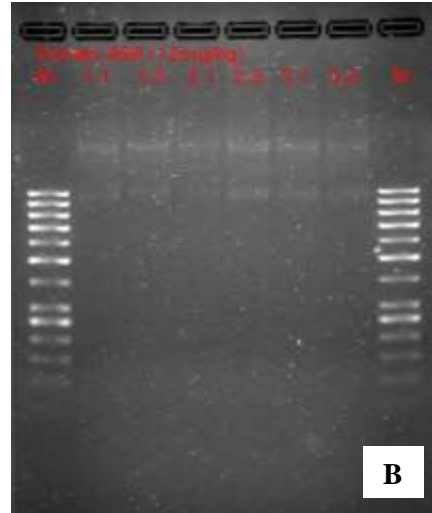
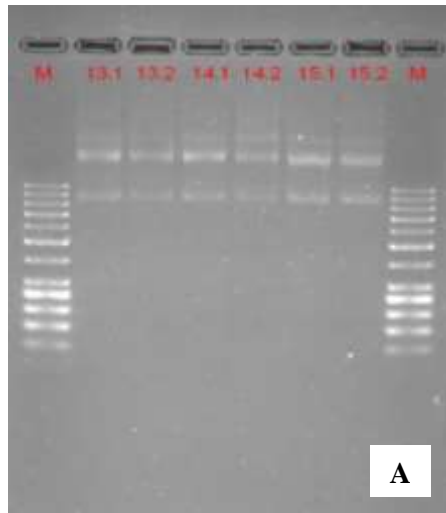


















Figura 1: Integridade de RNA, extraído de rim cranial, observado através de eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Dieta controlo (amostras 13,1; 13,2; 14,1; 14,2; 15,1; 15,2) (B) Extrato 469 (12 mg/kg) (amostras 1,1; 1,2; 2,1; 2,2; 3,1; 3,2); (C) Extrato 469 (6 mg/kg) (amostras 4,1; 4,2; 5,1; 5,2; 6,1; 6,2); (D) Extrato 558 (306 mg/kg) (amostras 7,1; 7,2; 8,1; 8,2; 9,1; 9,2); (E) Extrato 558 (153 mg/kg) (amostras 10,1; 10,2; 11,1; 11,2; 12,1; 12,2); e Extrato 488 (2000 mg/kg) (amostras 16,1; 16,2; 17,1; 17,2; 18,1; 18,2); **M** – marcador.





Tabela III: Fotografias dos peixes moribundos alusivas aos sinais clínicos observados.





Descrição dos sintomas	Fotografias
Peixes deitados no fundo do aquário com natação e respiração lentos. Cérebro hemorrágico.	
Movimentos rápidos de cabeça para baixo	
Olho opaco e exoftalmia. Cérebro hemorrágico.	

<p>Olho opaco e exoftalmia. Cérebro e boca hemorrágica.</p>	
<p>Boca muito hemorrágica</p>	
<p>Peixe encontrado no fundo do aquário com a respiração muito lenta</p>	
<p>Olho opaco e exoftalmia</p>	

<p>Dificuldade de flutuabilidade</p>	
<p>Boca muito hemorrágica com partes desfeitas</p>	
<p>Pigmentação bastante escura, boca hemorrágica e feridas ao longo do corpo</p>	
<p>Pigmentação muito escura, natação de cabeça para baixo, e por vezes muito rápida</p>	
<p>Olho opaco, exoftalmia e boca hemorrágica</p>	

<p>Natação lenta e perda de flutuabilidade</p>	
<p>Olho opaco e exoftalmia</p>	
<p>Pigmentação muito escura, natação na vertical e muito rápida</p>	
<p>Olho opaco, exoftalmia. Cérebro e boca hemorrágica.</p>	

<p>Olho opaco, boa hemorrágica e ferida na zona da barbatana caudal</p>	
<p>Olho opaco, exoftalmia e hemorragia no olho e rodopio.</p>	
<p>Rodopiar, natação muito lenta e perda de flutuabilidade</p>	
<p>Peixe encontrado no fundo do aquário de barriga para cima com natação muito lenta</p>	
<p>Pigmentação muito escura e perda de flutuabilidade</p>	

<p>Boca muito hemorrágica, natação lenta e na superfície</p>	
<p>Movimentos muito lentos, com tendência a perder a flutuabilidade. Cérebro hemorrágico.</p>	
<p>Natação muito lenta com dificuldades na flutuabilidade. Cérebro hemorrágico.</p>	
<p>Rodopiar</p>	





<p>Rodopiar, lesão na barbatana peitoral e na barbatana caudal</p>	
<p>Peixe de cabeça para baixo, com movimentos muito lentos</p>	
<p>Pigmentação escura, natação muito lente e boca hemorrágica</p>	
<p>Peixe muito agitado, e a saltar de divisória em divisória</p>	

Tabela IV: Concentração de RNA (ng/μL), pesos (mg) e respectivos rácios 260/280nm e 260/230nm para quantificação de vírus.

	Tratamento	Identificação das amostras	Peso (mg)	Concentração de RNA (ng/μL)	Ratio 260/280nm	Ratio 260/230nm
Peixes não-infetados	Extrato 558 (153 mg/kg)	B3	22,6	123,2	2,05	1,77
	Controlo	C1	41,4	185,4	2,08	1,97
	Extrato 469 (12 mg/kg)	F1	34	244,9	2,1	2,36
		F2	32,2	205,6	2,11	2,42
		F3	37,6	286,2	2,1	2,35
	Extrato 469 (6 mg/kg)	G1	38,3	273,8	2,1	2,32
		G2	31,4	197,5	2,1	2,3
		G3	31,8	158,7	2,09	2,3
	Extrato 488 (2000 mg/kg)	I1	38,6	236,7	2,1	2,33
		I2	30,2	225,8	2,07	2,07
		I3	32,5	157,4	2,1	2,31
	Extrato 558 (306 mg/kg)	L1	30,5	156,6	2,1	2,3
		L2	40,5	203,6	2,1	2,29
L3		33,5	158,8	2,09	2,29	
Peixes infetados	Extrato 469 (12 mg/kg)	A1	33,8	322,9	1,97	1,58
		A2	38,9	220,8	2,1	2,36
		A3	38,9	250,7	2,1	2,34
	Extrato 558 (306 mg/kg)	D1	31,5	201,1	2,07	2,08
		D2	35,6	190	1,92	1,47
		D3	38,7	285,3	2,1	2,36
	Extrato 558 (153 mg/kg)	E1	36	202	2,11	2,36
		E2	34,8	404,3	2,12	2,35
		E3	38,9	241,2	2,06	2
	Extrato 488 (2000 mg/kg)	H1	37,6	364,6	2,11	2,39
		H2	30,4	159,6	2,1	2,35
		H3	35,4	235,6	2,1	2,35

	Controlo	J1	32,3	232,6	2,1	2,35
		J2	30,5	187,4	2,09	2,31
		J3	41,5	45,3	2,02	1,73
	Extrato 469 (6 mg/kg)	M1	40,2	320,1	2,1	2,15
		M2	40	184,4	2,1	2,24
		M3	40,7	212,6	2,07	2,1
Peixes moribundos	1	36,1	325,7	2,1	2,34	
	2	31,5	406,8	2,09	2,25	
	3	31,7	241,5	2,1	2,26	
	4	42,5	268,4	2,11	2,33	
	5	37,2	254,9	2,1	2,33	
	6	39	488,2	1,95	1,5	
	7	33	261,9	2,03	1,88	
	8	36,9	382,1	2,1	2,32	
	9	43,6	364,9	2,11	2,32	
	10	31,1	219,7	2,07	2,14	
	11	3,4	261,7	2,09	2,27	
	12	33,1	265,6	2,05	1,97	
	13	35,3	236,4	1,99	1,64	
	14	32,3	234,0	2	1,73	
	15	36,2	225,3	2,1	2,33	
	16	30,3	204,6	1,86	1,26	
	17	34,7	305,8	2,03	1,84	
	18	31,1	245,6	2,1	2,36	
	19	36,4	301,2	2,04	1,91	
	20	37,7	394,3	1,96	1,58	
	21	33,1	277,8	2,1	2,29	
	22	39,6	427,3	2,1	2,36	
	23	34,6	368,5	2,1	2,33	
	24	38,7	548,7	2,11	2,43	
	25	31,5	201,4	2,09	2,25	
	26	37,1	314,6	2,09	2,38	

	27	33,1	321,1	1,96	1,61
	28	40,6	344,3	2,02	1,83
	29	40,4	279,8	2,04	2,02
	30	39,3	166,2	2,01	1,86
	31	41,7	288,4	1,9	1,42
VNN		-	2,4	-	-

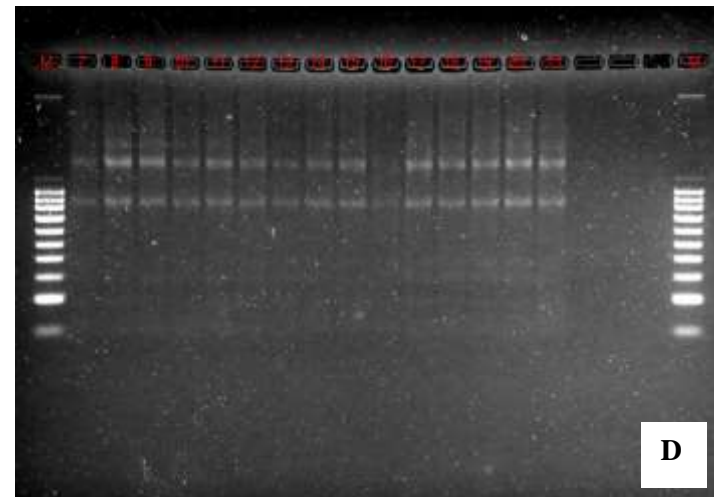
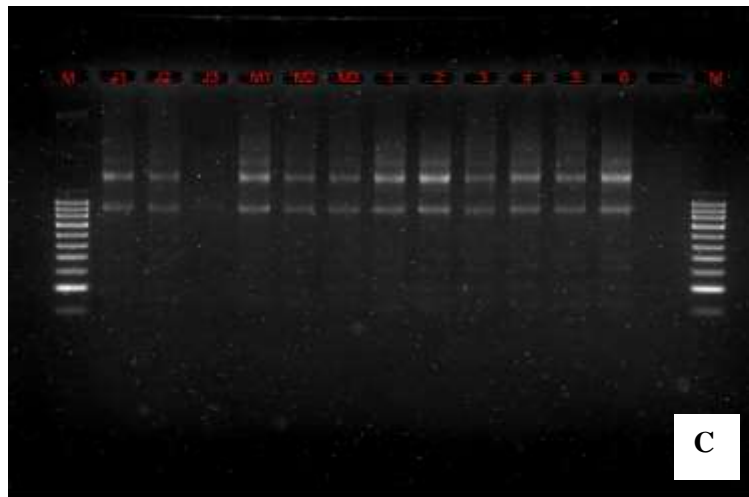
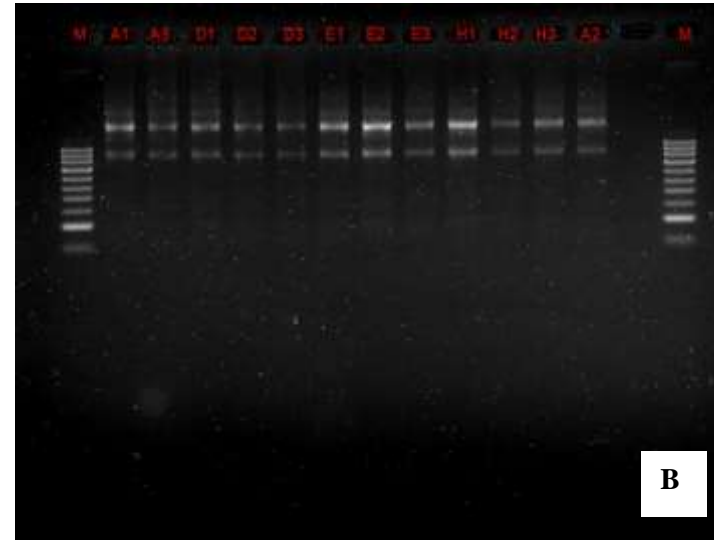
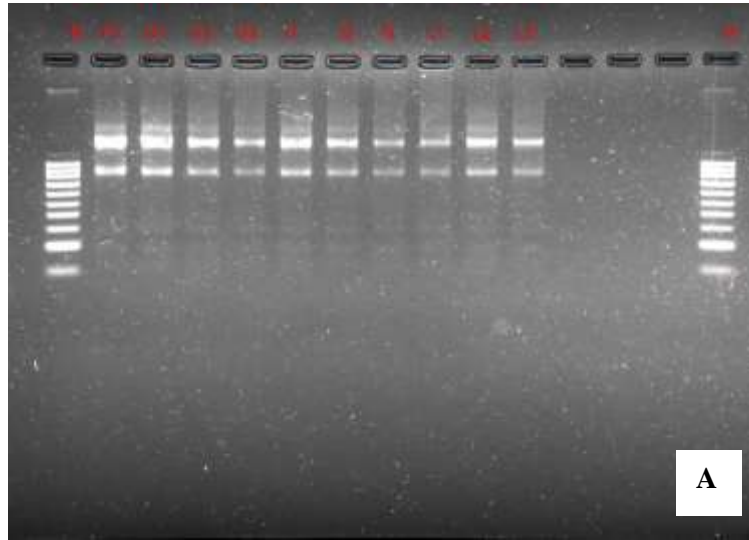


Figura 2: Integridade de RNA, extraído do tecido cerebral e observado através de eletroforese em gel de agarose 2% de cada uma das amostras. **(A)** Peixes não-infetados (F: Extrato 469 (12 mg/kg); G: Extrato 469 (6 mg/kg); I: Extrato 488 (2000 mg/kg); L: Extrato 558 (306 mg/kg)); **(B)** Peixes infetados (A: Extrato 469 (12 mg/kg); D: Extrato 558 (306 mg/kg); E: Extrato 558 (153 mg/kg); H: Extrato 488 (2000 mg/kg)); **(C)** Peixes infetados (J: Controlo; M: Extrato 469 (6 mg/kg)) e moribundos (1 a 6); **(D)** Peixes moribundos (7 a 21); **M** – marcador.