

**Ocorrência do Parasita *Calceostoma glandulosum* (Monogenea)
em corvina, *Argyrosomus regius***

Maria Carolina de Sousa Ribeiro

**Ocorrência do Parasita *Calceostoma glandulosum* (Monogenea)
em corvina, *Argyrosomus regius***

Maria Carolina de Sousa Ribeiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Florbela Soares e coorientação
Especialista em Aquacultura Teresa Baptista

Título: Ocorrência do parasita *Calceostoma glandulosum* (Monogenea) em corvina, *Argyrosomus regius*

Copyright © Maria Carolina de Sousa Ribeiro

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/relatório de estágio 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.

Este trabalho foi financiado pelos projetos DIVERSIAQUA II (MAR2020-P02M01-0656P), SAUDE&AQUA (MAR-02.05.01-FEAMP-0009), liderados pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) e realizado na Estação Piloto e de Piscicultura de Olhão (EPPO). Para o mesmo, foram utilizadas corvinas nascidas nesta estação e as infraestruturas e meios disponíveis para as amostragens biológicas e análises laboratoriais. Ao IPMA reserva-se o direito de utilizar toda a informação contida neste trabalho para efeitos de publicações, relatórios da identidade financiadora e divulgação ao público em geral.

Agradecimentos

À minha mãe, Leonor, e ao meu pai, Paulo, agradeço profundamente por todos os esforços que fizeram por mim ao longo destes anos, por terem ultrapassado todas as vossas oposições por mim, por me fazerem ver que o mundo lá fora não é fácil, por me encorajarem a seguir os meus sonhos, dando-me cada vez mais força para continuar a lutar e conseguir alcançar os meus objetivos, por me terem ensinado que desistir não é a solução, por me terem ensinado todos os valores que fazem de mim a mulher que sou hoje, por me darem asas para voar. A vocês eu devo muito e espero que estejam muito orgulhosos de todo o meu percurso e pela pessoa que me tornei. Eu amo-vos.

À avó Rosa por ter sido uma segunda mãe para mim e por me fazer perceber que a vida não irá durar para todo o sempre sendo essencial aproveitar cada momento como se fosse o último.

A toda a minha família pelo carinho, preocupação e por me acompanharem em todas as fases importantes na minha vida e um especial agradecimento ao meu afilhado Lucas por ter aparecido na minha vida e que veio alegrar o meu coração. Mesmo pequenino mostrou-me que é um menino muito corajoso e espero que um dia sigas todos os teus sonhos como eu segui os meus e durante todo esse tempo estarei aqui para ti, a mostrar que tudo pode ser possível.

Aos meus padrinhos, Marta e Rodrigo, que me acompanharam durante todo o meu crescimento e me ajudaram a tomar decisões importantes, uma delas é estar a escrever esta tese. Vocês são um exemplo para mim, ensinam-me a contornar os obstáculos da vida e a não desistir ao primeiro impasse. Aos pais dos meus padrinhos, Alzira e Dinis, um agradecimento especial por estarem sempre presentes.

A ti, Roberto, por nunca teres desistido, por teres acreditado em todas as minhas loucuras, por todas as aventuras, pelas visitas, nem que fosse ao outro lado do mundo, por suportares todas as minhas inseguranças, por teres sido o meu ombro, por me teres ensinado que não posso dar nada por garantido, mas obrigado acima de tudo por seres o meu melhor amigo. Quero ainda agradecer-te por me fazeres a mulher mais feliz do universo.

A todos os meus amigos que me apoiaram sempre em tudo, por partilharem as minhas conquistas, por todos os conselhos e por poder contar sempre com eles.

Agradeço à Doutora Florbela Soares por ser orientadora da minha tese e à Doutora Cátia Marques pelo conhecimento que me transmitiram e pelo auxílio prestado durante o meu percurso na EPPO.

Ao Doutor Pedro Pousão pela oportunidade de realizar a minha tese nas instalações da EPPO.

Agradecimento aos projetos DIVERSIAQUA II (MAR2020-P02M01- 0656P), SAUDE&AQUA (MAR-02.05.01-FEAMP-0009) e Be4AQUAHEALTH (MAR-02.05.01-FEAMP-0013), liderado pelo Instituto Politécnico de Leiria.

À equipa de patologia, por todo o companheirismo, amizade, pelo conhecimento dado e por me terem ajudado na resolução de diversos problemas que me surgiam ao longo do trabalho.

A toda a restante equipa da EPPO pela ajuda incansável durante estes meses.

Resumo

As práticas de cultivo exercidas inadequadamente podem prejudicar a saúde dos peixes e originar surtos de doenças por parasitas, muitas das vezes provocados pelas elevadas densidades que aumentam as taxas de transmissão entre os animais. Ao longo dos anos, o número de parasitas nas aquaculturas tem vindo a aumentar, nomeadamente de monogéneos. Estes são ectoparasitas que podem ser, maioritariamente, encontrados nas superfícies externas do hospedeiro, alojando-se nas brânquias, pele e barbatanas através de um órgão de fixação, o *haptor*. Com ciclo de vida direto e rápido, a transmissão ocorre facilmente infetando um maior número de peixes, prejudicando a sua saúde. O objetivo deste trabalho foi conhecer a espécie *Calceostoma glandulosum*, que afeta a corvina (*Argyrosomus regius*), caracterizando-a morfológica e filogeneticamente, compreender o seu ciclo de vida e o efeito da temperatura na reprodução, principalmente a ocorrência de ovos, o desenvolvimento do embrião e a sua eclosão. A especificidade e a determinação de um método eficaz para a eliminação total de parasitas das brânquias também foram estudadas. *C. glandulosum*, caracterizado por possuir ovos tetraédricos, é extremamente afetado pelas oscilações da temperatura da água, possuindo um comportamento sazonal, sendo a sua ocorrência nula no inverno e valores máximos à temperatura de 17°C (primavera e outono), baixando a sua ocorrência no verão, com temperaturas mais elevadas. Os ovos foram recolhidos com sucesso, utilizando fios de algodão dispersos nos tanques de cultivo de corvina. A temperatura de incubação afetou, também, a viabilidade do embrião, demonstrando que quanto menor for a temperatura, maior é o número de ovos inviáveis. A taxa de eclosão dos ovos foi 100% a uma temperatura de 23°C. O método testado que apresentou melhores resultados para eliminar os monogéneos das brânquias foi o formol a 300 ppm, quando comparado com o formol a 200 ppm, 2-fenoxietanol e água doce. Em conclusão, *C. glandulosum* possui um limite tolerável de temperatura, entre os 14°C e os 25°C, no qual tem a capacidade de sobreviver e reproduzir-se. Foi possível observar que este parasita possui um hospedeiro específico, *A. regius*, pois esta espécie não foi observada noutras espécies de peixes presentes na EPPO.

Palavra-Chave: Aquacultura, Parasitas em Peixes, Monogénea, *Argyrosomus regius*, *Calceostoma glandulosum*

Abstract

Improper farming practices can damage fish health and lead to disease outbreaks by parasites, often caused by high stocking densities that increase transmission rate between animals. Over the years, the number of parasites in aquacultures have been increasing, particularly monogeneans. These are called ectoparasites that can mostly be found on the external surface of host, lodging in the gills, skin and fins through an attachment organ, the *haptor*. With a direct and fast lifespan, transmission occurs easily, infecting a larger number of fish, damaging their health. The aim of this work was to know *Calceostoma glandulosum*, which affects meagre (*Argyrosomus regius*), characterizing it morphologically and phylogenetically, understanding life cycle and how temperature affects its reproduction, especially the occurrence of eggs, embryo development and hatching. The specificity and determination of an effective method for the total elimination of gill parasites were also studied. *C. glandulosum*, characterized by having tetrahedral eggs, is extremely affected by fluctuations in water temperature, having a seasonal behaviour, without production in winter and maximum values at 17°C (spring and fall), decreasing in summer, with higher temperatures. Eggs were successfully collected using cotton threads dispersed in meagre tanks. Incubation temperature also affected embryo viability, showing that the lower temperature, more is the number of unviability eggs. Hatching rate was 100% at temperature 23°C. The tested method that showed better results for eliminating monogeneans from the gills was formalin at 300 ppm, when compared to formalin at 200 ppm, 2-phenoxyetanol and freshwater. In conclusion, *C. glandulosum* has a tolerable temperature range, between 14°C and 25°C, which it has the ability to survive and reproduce. It was possible to observe that this parasite has a specific host, *A. regius*, because this specie has not been found in other fish present in EPPO.

Keywords: Aquaculture, Fish parasites, Monogenea, *Argyrosomus regius*, *Calceostoma glandulosum*

Índice

1.Introdução.....	20
1.1.Aquacultura	20
1.2.Parasitas Externos em Peixes Marinhos.....	22
1.2.1.Monogenea	23
1.3.Corvina.....	27
2.Objetivos	29
3.Materiais e Métodos	30
3.1.Caracterização das diferentes fases de vida de <i>Calceostoma glandulosum</i>	30
3.1.1.Recolha de ovos.....	30
3.1.2.Larva (<i>Oncomiracidium</i>)	31
3.1.3.Organismo Adulto	34
3.2.Identificação Filogenética	34
3.3.Ensaio 1 – Efeito de diferentes substratos na ocorrência de ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i>.....	35
3.4.Ensaio 2 – Efeito da temperatura nos ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i>	36
3.5.Ensaio 3 - Especificidade de <i>Calceostoma glandulosum</i>	37
3.6.Ensaio 4 – Teste de diferentes produtos na eliminação do parasita <i>Calceostoma glandulosum</i> das brânquias de <i>Argyrosomus regius</i> em laboratório.....	38
3.7.Análise Estatística	39
4.Resultados	39
4.1.Caracterização das diferentes fases de vida de <i>Calceostoma glandulosum</i>	40
4.1.1.Ovos	41
4.1.2.Caracterização da <i>oncomiracidium</i> de <i>Calceostoma glandulosum</i>.....	41
4.1.3.Caracterização de <i>Calceostoma glandulosum</i> na fase adulta	43
4.2.Identificação Filogenética	44

4.3.Ensaio 1 – Efeito de diferentes substratos na ocorrência de ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i>	44
4.4.Ensaio 2 – Efeito da temperatura nos ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i>	45
4.4.1.Ocorrência de ovos de <i>C. glandulosum</i>	45
4.4.2.Viabilidade dos ovos de <i>C. glandulosum</i>	46
4.4.3.Incubação de ovos.....	47
4.5.Ensaio 3 – Especificidade de <i>Calceostoma glandulosum</i>	47
4.6.Ensaio 4 – Teste de diferentes produtos na eliminação do parasita <i>Calceostoma glandulosum</i> das brânquias de <i>Argyrosomus regius</i> em laboratório.....	48
5.Discussão	50
6.Conclusão	61
7.Referências.....	63
8.Anexo.....	77

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Divisão corporal de monogéneos <i>Dactylogyrus sp.</i> . Adaptado de: Robert <i>et al</i> , 2012	24
Figura 1.2 - Ciclo de vida das diferentes estratégias reprodutivas de parasitas monogénicos: a) oviparidade; b) viviparidade. Adaptado de: Behrmann-Godel <i>et al</i> , 2015.	25
Figura 3.1 - Representação esquemática da determinação das dimensões dos ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i> . Escala: 100 µm. Original do autor	31
Figura 3.2 - Baldes de infeção para determinar a fecundidade e maturação sexual de <i>Calceostoma glandulosum</i> em <i>Argyrosomus regius</i> . Original do autor.....	33
Figura 3.3 - Tubos com malha de 55 µm à esquerda e 125 µm à direita. Original do autor ..	34
Figura 3.4 - Malha de 50 µm para observar os ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i> após filtração à lupa, Nikon SMZ1000. Original do autor	34
Figura 3.5 - Substratos testados para fixação de ovos de monogéneos (algodão, corda, plástico poliestireno e plástico polipropileno). Original do autor	36
Figura 3.6 - Estrutura utilizada para proteger os diferentes substratos de fixação de ovos, instalada na comporta de saída de água dos tanques de terra. Original do autor	36
Figura 3.7 - Tanque de tratamento com formol em <i>Argyrosomus regius</i> . Original do autor..	39
Figura 4.1 - a) ovo e b) indivíduo adulto de <i>Diplectanum sp.</i> encontrado nas brânquias de <i>Argyrosomus regius</i> visualizado ao microscópio ótico numa ampliação de 400x. Escala:100µm. Original do autor.	40
Figura 4.2 - Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Calceostoma glandulosum</i> . Escala: 100µm (ovos e <i>oncomiracidium</i>); Ampliação de 100x do organismo adulto. Original do autor. Ilustração <i>Argyrosomus regius</i> retirado de: Meagre (<i>Argyrosomus regius</i>) – Akvatek Aquaculture Inc.,n.d.).....	40
Figura 4.3 - Desenvolvimento do embrião de <i>Calceostoma glandulosum</i> dentro do ovo, classificado em quatro fases de desenvolvimento do embrião de: a) Fase I - Não embrionado/Danificado, com uma ampliação de 100x; b) Fase II - Embrionado, ampliando a 100x; c) Fase III - Em desenvolvimento, observado numa ampliação de 400x; Fase IV - Eclodido, utilizando uma ampliação de 100x. A escala representada na figura corresponde a 100µm. Escala de 100 µm. Original do autor	41

Figura 4.4 - <i>Oncomiracidium</i> do monogéneo <i>Calceostoma glandulosum</i> , observada com uma ampliação de a) 400x; b)100x. Escala de 100 µm. Original do autor	42
Figura 4.5 - Fecundidade de <i>Calceostoma glandulosum</i> após infecção de <i>Argyrosomus regius</i> com uma única <i>oncomiracidium</i> . (Até ao dia 14 o n=6, de 14 a 21 n=4; a partir do dia 22 n=3)	42
Figura 4.6 - Visualização de <i>Calceostoma glandulosum</i> na fase adulta (esquerda) ao microscópio ótico numa ampliação de 40x, escala de 1mm e com destaque para o haptor (direita), observado a uma ampliação de 100x. Escala: 100µm. Original do autor.	43
Figura 4.7 - Fragmento de DNA de <i>C. glandulosum</i> com um tamanho de 129 pb com a respetiva escala da <i>ladder</i> V do lado esquerdo.....	44
Figura 4.8 - Fixação de ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i> em diferentes substratos: Poliestireno, Polipropileno, Algodão e Corda de Nylon; recolhido do tanque de reprodutores (R) de <i>Argyrosomus regius</i> : R3, R7 e R8, representado pela média do número de ovos por cm por dia. a, b, c, d, e, f e g representam os pares com diferenças estatisticamente significativas.	45
Figura 4.9 - Ocorrência de ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i> nos tanques de reprodutores de <i>Argyrosomus regius</i> em função da temperatura.	46
Figura 4.10 - Desenvolvimento do embrião dentro do ovo em função da temperatura, dividido por diferentes fases: Fase I – não embrionado; Fase II – embrionado; Fase III – em desenvolvimento; Fase IV - eclodido, recolhido nos tanques dos reprodutores de <i>Argyrosomus regius</i> : R3, R7, R8, correspondendo a temperaturas de 14°C, 17°C e 16°C, representado por número de ovos por cm por dia.....	46
Figura 4.11 - Taxa de eclosão dos ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i> a temperaturas distintas: 17°C, 19°C, 21°C, 23°C e 25°C durante 48 horas	47
Figura 4.12 - Representação gráfica dos tratamentos efetuados em <i>Argyrosomus regius</i> para eliminar monogéneos presentes nas brânquias, nos quais foram utilizados: formol a 200 ppm e a 300 ppm, água doce e 2-fenoxietanol. Os dados foram representados em número de ovos por indivíduo ao longo dos dias.....	49
Figura 4.13 - <i>Argyrosomus regius</i> com ocorrência de lesões durante o tratamento de formol a 200ppm. Original do autor	49

Índice de Tabelas

Tabela 1-I - Monogéneos comuns em aquaculturas de <i>Argyrosomus regius</i>	29
Tabela 3-I - Descrição do número de indivíduos (Nº Ind.), do peso médio (P. Médio), do comprimento total médio (CT Médio) e da densidade de <i>Argyrosomus regius</i> presentes nos tanques dos reprodutores (R), R3, R7 e R8. Os valores do peso e do comprimento médio são apresentados como o valor médio dos pesos/comprimento mais ou menos o desvio padrão..	30
Tabela 3-II - Descrição do número de indivíduos (Nº Ind) e da densidade das diferentes espécies de peixes marinhos nos tanques de terra (T) T2 e T5	31
Tabela 3-III - Número de indivíduos das diversas espécies presentes nos tanques de reprodutores (R)	37
Tabela 4-I - Intensidade (número de parasitas/hospedeiro) de <i>Calceostoma glandulosum</i> em <i>Argyrosomus regius</i> com os respetivos dados do peso, do comprimento total (CT) e do índice de condição (IC).....	43
Tabela 4-II - Contagem total de ovos de <i>Calceostoma glandulosum</i> presente nos tanques de reprodutores: R1 - <i>Sparus aurata</i> ; R3 - <i>Argyrosomus regius</i> ; R4 - <i>Diplodus sargus</i> ; R5 - <i>Seriola rivoliana</i> ; R7 - <i>Argyrosomus regius</i> ; R8 - <i>Argyrosomus regius</i> ; a, b, c representam os pares que apresentam diferenças estatisticamente significativas	48

Lista de Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

bp: Pares de bases

CT: Comprimento Total

DHA: Ácidos Docosahexaenóicos

EPA: Ácidos Eicosapentaenóicos

EPPO: Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

HMDS: Hexamethyldisilazane

IPMA: Instituto Português do Mar e da Atmosfera

Nº: Número

NE: Tampão de eluição

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

ppm: Partes por milhão

PUFAs; Ácidos Gordos Polinsaturados

R: Tanque de Reprodutores

T: Tanque de Terra

UV: Ultravioleta

V: Volts

°C: Graus Celsius

1. Introdução

1.1. Aquacultura

O consumo de peixe tem aumentado ao longo das últimas décadas (López-Mas *et al*, 2021), estando presente na alimentação humana devido ao seu elevado valor nutricional, que representa um teor de proteína mais elevado do que qualquer outro animal e com preços mais acessíveis (Balami *et al*, 2019). É um alimento rico em vitaminas, minerais, hidratos de carbono (Abraha *et al*, 2018) e gorduras, como ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), ácidos eicosapentaenóicos (EPA), e ácidos docosahexaenóicos (DHA) (Mohanty *et al*, 2019).

A grande escala da população mundial e o seu crescimento a um ritmo acelerado pode levar à perda da diversidade biológica (Crist *et al*, 2017), não só pelo aumento do esforço de pesca que sobre exploram os recursos marinhos, mas também pela escorrência de fertilizantes, poluição de plásticos, acidificação dos oceanos, aumento da temperatura da água, entre outros fatores consequentes às atividades antropogénicas (Longo *et al*, 2019). Por conseguinte, a aquacultura aparece como forma de fornecer alimento à população mundial, produzindo grandes volumes a uma velocidade mais rápida, proporcionando um impacto económico que suporta cerca de 50% do pescado consumido nos dias de hoje (Fazio, 2019). Esta prática permite, igualmente, providenciar alimentos nutricionalmente mais seguros e com produção mais sustentável do ponto de vista ambiental (Gephart *et al*, 2020) facilitando o abastecimento a toda a comunidade, incluindo as populações mais pobres e com baixa segurança alimentar (Long *et al*, 2019).

Com o passar dos anos, a sustentabilidade tem vindo a ser prioridade neste setor. O termo sustentável entende-se como a produção rentável de organismos aquáticos, mantendo uma interação equilibrada e contínua nos seus ecossistemas e comunidades locais, utilizando esses recursos naturais de forma racional sem que o ambiente ao seu redor seja degradado (Valenti *et al*, 2011). Apesar da evolução das estratégias sustentáveis e da implementação de novas tecnologias (Bui *et al*, 2019) neste setor, a aquacultura começou a ser cada vez mais intensiva, envolvendo uma maior manipulação na produção do pescado, o que resultou no aumento das perturbações durante todo o processo (Gabriel & Akinrotimi, 2011) tornando-os mais suscetíveis a surtos de doenças, representando um dos maiores desafios em aquacultura (Ariel & Olesen, 2002). As doenças que ocorrem em indivíduos produzidos em cativeiro podem ser causadas por vírus, bactérias, fungos e/ou parasitas (Stentiford *et al*, 2017; Bondad-Reantaso *et al*, 2005). Esses agentes infecciosos trazem impactos negativos na produção do pescado, pois estes, quando infetados tendem a perder o apetite, o que torna o crescimento extremamente lento (Tavares-Dias & Martins, 2017) e a diminuição do sistema imunitário pode originar

elevadas mortalidades, que resultam em grandes perdas económicas. Assim, existe a necessidade de controlar e prevenir a presença de quaisquer agentes patogénicos para que a aquacultura tenha sucesso, procurando novas soluções para este problema (Bui *et al*, 2019).

As práticas de cultivo exercidas inadequadamente podem prejudicar a saúde dos peixes e originar surtos de doenças, muitas das vezes provocados pelas elevadas densidades de cultivo, onde o contacto entre indivíduos é mínimo, o que leva a maiores taxas de transmissão de patologias (Krkošek, 2010), grandes ou repentinas alterações na temperatura da água, fraca qualidade da água e o seu estado nutricional. Estes fatores contribuem para alterações fisiológicas (Reverter *et al*, 2014) em consequência do stress, o que os torna os animais mais suscetíveis a infeções promovendo a fragilidade do sistema imunitário (Stratev *et al*, 2018).

O sistema imunitário tem a função de proteger o organismo contra doenças, identificando e eliminando o patógeno, de forma a manter a homeostasia durante o seu desenvolvimento, crescimento e após a reação inflamatória (Magnadottir, 2010). Este manifesta-se de duas formas: através da resposta imune inata, correspondendo à primeira linha de defesa contra a infeção, utilizando recetores codificados pela linha germinal como forma de reconhecimento (Dezfuli *et al*, 2016), sendo composta por barreiras físicas e componentes celulares e humorais (Castro & Tafalla, 2015); e pela resposta imune adaptativa ou adquirida, exclusiva de vertebrados, desencadeada por recetores de antígenos específicos que identificam, primeiramente, o agente infeccioso, de maneira a que após a sua exposição repetida, o sistema imunitário produza uma resposta mais eficaz para o eliminar (Dezfuli *et al*, 2016).

Os monogéneos são uma das principais espécies de helmintes que são encontrados em peixes de cativeiro. As infeções parasitárias são manifestadas através de alguns sinais no comportamento do peixe bem como da aparência externa, tais como movimentos letárgicos, natação junto da superfície, barbatanas presas, falta de apetite, exoftalmias, produção excessiva de muco e movimentos operculares mais frequentes (Reed *et al*, 2012), que podem ser agravados com o tempo causando efeitos mais agressivos como hemorragias, hiperplasia nas brânquias e, por fim, levar a grandes mortalidades. Para além da observação deste comportamento dos peixes, o diagnóstico também é realizado através da visualização ao microscópio do muco produzido na pele e pela presença/ausência de parasitas ou de ovos nas brânquias (Jithendran, 2014).

Ao longo dos anos a ocorrência de parasitas têm vindo a aumentar cada vez mais nos sistemas de aquacultura, recorrendo à utilização de tratamentos convencionais, como antiparasitários, quimo-terapêuticos e inseticidas para controlar as infeções (Khater *et al*, 2017).

Os tratamentos direcionados às infecções monogénicas podem ser classificados como profiláticos, com administração via oral, ou curativos, onde é ministrado oralmente ou através de um banho com o intuito de extinguir todos os patógenos presentes no hospedeiro (Ingelbrecht *et al*, 2020). Todavia, ambos os tipos de terapia utilizam substâncias químicas e muitas das vezes tóxicas para os peixes (Schmahl & Taraschewski, 1987), podendo prejudicar do mesmo modo a qualidade da água, o ambiente envolvente e representar um risco para a saúde humana, devido aos resíduos que se acumulam no músculo do peixe (Doan *et al*, 2020). No entanto, os ovos destes indivíduos têm vindo a ganhar resistência a estes químicos, direcionando o tratamento específico para a remoção dos organismos adultos no hospedeiro (Sitjà-Bobadilla *et al*, 2006). Daí ser essencial recolher toda a informação sobre a produção de ovos, dos embriões, da eclosão, do crescimento do parasita, das taxas de desenvolvimento e da idade que a maturação sexual é atingida, para que sejam desenvolvidas estratégias de gestão e controlo da população de parasitas nas aquaculturas (Lackenby *et al*, 2007).

1.2. Parasitas Externos em Peixes Marinhos

Os parasitas são organismos comensais que se instalam e sobrevivem através da extração de alimento de um hospedeiro, para a obtenção de energia, direcionando-a para a sua reprodução. A sua presença pode trazer efeitos negativos ao hospedeiro (Barber *et al*, 2000; Lafferty & Kuris, 2009; Patterson & Ruckstuhl, 2013). Estes podem ser caracterizados por ectoparasitas ou endoparasitas. Os ectoparasitas fixam-se às superfícies externas do hospedeiro, tais como brânquias, pele e olhos, enquanto os endoparasitas atacam os órgãos vitais, nomeadamente intestino, coração, fígado, entre outros (Mitiku, 2017). O ciclo de vida dos parasitas pode ser simples ou complexo, estando dividido em três fases: crescimento, reprodução e transmissão. Num ciclo de vida complexo pode haver dois, três ou quatro hospedeiros. A sua transmissão pode ocorrer através da procura de um hospedeiro, por parte da larva eclodida de um ovo presente na coluna de água ou no substrato, podendo seguir-se para a predação do animal infetado, onde, primeiramente, o parasita encontrado em fase larvar ou juvenil num hospedeiro intermédio, vai ser predado por um hospedeiro definitivo e este vai finalmente atingir a sua maturação sexual (Poulin & Leung, 2010). Contrariamente ao ciclo de vida direto, em que os parasitas que se encontram maturados sexualmente são transferidos de um hospedeiro para o outro, o que permite uma maior distribuição geográfica (Robar *et al*, 2010).

Não obstante, os parasitas são uma parte essencial em muitos ecossistemas devido a atuarem como agentes de seleção natural o que contribui para a organização das comunidades (Reverter *et al*, 2016). Todavia, estes organismos podem causar grandes problemas a nível bioquímico,

fisiológico ou ecológico (Lucius & Poulin, 2017), o que enfraquece o sistema imunitário do hospedeiro, aumentando a suscetibilidade a infecções secundárias por parte de outros patógenos, nomeadamente bactérias (Ekanem *et al*, 2011), provocando diretamente efeitos prejudiciais à população e ao seu valor nutricional (Abdullah, 2013).

No geral, os habitats aquáticos oferecem condições ótimas para a manutenção e evolução dos parasitas, dado que é considerado um ambiente estável, facilitando a dispersão e sobrevivência dos ovos e estágios iniciais. De certo modo, os peixes têm um papel fundamental para os parasitas, pois apresentam uma área de superfície adequada à sua colonização (Barber *et al*, 2000).

A diversidade e a abundância de parasitas diferem de população para população e os padrões de infecção podem ser influenciados por fatores químicos ou físicos, por exemplo: o tamanho do habitat e a distância entre eles; pH; dieta do hospedeiro ou até mesmo a posição na cadeia trófica (Bagge *et al*, 2004; Karvonen *et al*, 2013). Em aquacultura, a introdução de espécies exóticas pode originar surtos de doenças causados por parasitas, característicos de outras zonas geográficas. Os problemas ambientais também podem estar associados a esses surtos, bem como a fraca qualidade da água do cultivo ou por influência de outros fatores, mas principalmente devido às elevadas densidades que podem levar a mortalidades em massa (Pulkkinen *et al*, 2010).

Contudo, alguns patógenos, como bactérias, vírus e parasitas, não originam problemas apenas na saúde dos peixes, mas também nos seres humanos, originando gastroenterites ligeiras ou problemas mais graves que podem levar à sua morte (Shamsi, 2019), principalmente se o pescado for consumido cru ou mal cozinhado (Williams *et al*, 2020). No passado, estas doenças apenas limitavam as populações locais que viviam junto da costa, mas com o crescimento dos mercados internacionais, do melhoramento dos transportes e das mudanças demográficas essas fronteiras foram-se expandindo (Amer, 2014).

1.2.1. Monogenea

Os monogéneos são parasitas pertencentes à Classe Monogenea, do Filo Plathelminthes, que se ramifica em duas subclasses, a Monopisthocotylea e a Polyopisthocotylea, abrangendo mais de 5500 espécies e correspondendo a 750 géneros de monogéneos (Paladini *et al*, 2017). São, geralmente, encontrados em vertebrados marinhos e em alguns invertebrados (Reed *et al*, 2012), bem como em peixes de água doce (Pimentel-Acosta *et al*, 2019). Os organismos da subclasse Monopisthocotylea alimentam-se do muco e de células epiteliais (Rani & Upadhyay, 2019), alojando-se nas superfícies externas do hospedeiro, essencialmente nas brânquias, pele

e barbatanas, classificando-os, assim, como ectoparasitas (Makesh *et al*, 2015). Contrariamente, a subclasse Polyopisthocotylea alimenta-se exclusivamente do sangue do hospedeiro (Ogawa, 2014).

Estes organismos apresentam simetria bilateral, cuja superfície dorsal do corpo é convexa, contrariamente à dorsal que se apresenta côncava. Não possuem coloração e o seu corpo, revestido por um fino tegumento (Cheng, 2012), pode dividir-se em três zonas: região cefálica (anterior à faringe), tronco e *hopishaptor* (Figura 1.1). Os monogêneos são caracterizados pela existência de um órgão de fixação posterior denominado de *haptor*, composto por ganchos, âncoras (*hamulli*) ou ventosas provocando lesões nos órgãos onde se anexam (Jerônimo *et al*, 2016). Já na extremidade anterior exibem um *prohaptor*, principal estrutura de fixação e de alimentação, composta por musculatura ou por glândulas cefálicas, que vão libertando substâncias adesivas. Estas duas estruturas auxiliam a movimentação do parasita ao longo das superfícies, libertando alternadamente as extremidades anterior e posterior (Drago, 2017).

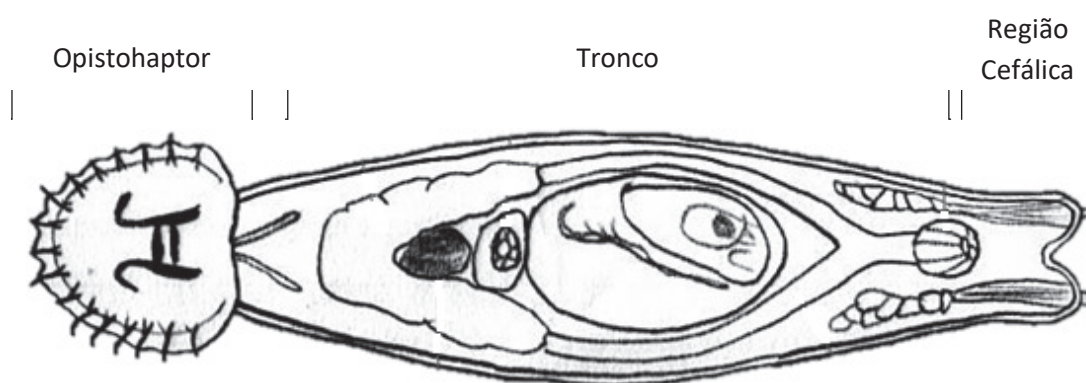


Figura 1.1 - Divisão corporal de monogêneos *Dactylogyrus sp.*. Adaptado de: Robert *et al*, 2012

Com ciclo de vida direto, isto é, não havendo envolvimento de hospedeiros intermédios, estes parasitas são hermafroditas protândricos, possuindo ambos os órgãos copulatórios, onde o sistema masculino se desenvolve primeiro que o feminino. Estes podem ter estratégias reprodutivas distintas, tais como: oviparidade; viviparidade; e a autofertilização (Hoai, 2020). Grande parte dos monogêneos são ovíparos capazes de produzir uma quantidade elevada de ovos (Marchiori *et al*, 2013) revestindo o embrião por uma cápsula resistente que possui apenas uma abertura circular, tapada pelo opérculo, permitindo a eclosão da larva ciliada *oncomiracidium* (Kearn, 2018) (Figura 1.2a) (Blahoua *et al*, 2018). Por outro lado, das 22 famílias de monogêneos, a maioria da família Gyrodactylidae são organismos vivíparos que geram *oncomiracidia* completamente desenvolvidas, capazes de nadar livremente até encontrar

o hospedeiro mais adequado, fixando-se na superfície deste ou são arrastadas através do fluxo de água gerado em direção às brânquias (Ogawa, 2014). Esta estratégia reprodutiva de viviparidade permite que sejam criadas três gerações em simultâneo no útero dos parasitas (Figura. 1.2b) (Buchmann *et al*, 2004). Por último, a autofertilização somente ocorre em monogêneos que infetam os anfíbios ou quando um parasita se encontra sozinho num hospedeiro, assegurando, assim, o seu potencial reprodutivo (Hoai & Hutson, 2014).

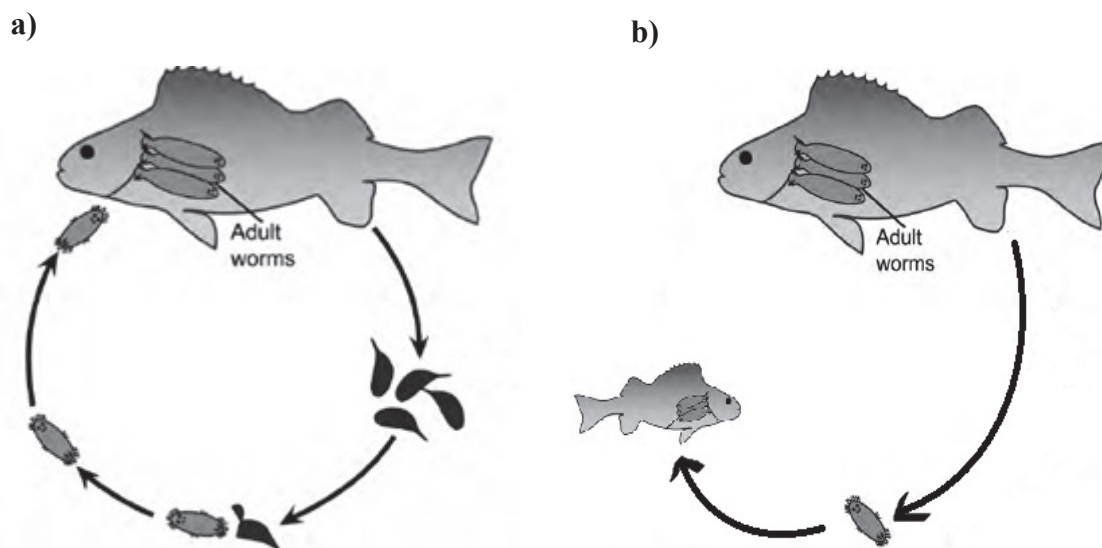


Figura 1.2 - Ciclo de vida das diferentes estratégias reprodutivas de parasitas monogênicos: a) oviparidade; b) viviparidade. Adaptado de: Behrmann-Godel *et al*, 2015.

Os monogêneos, na sua maioria, possuem um hospedeiro específico, embora em alguns casos a mesma espécie pode infetar uma variedade de hospedeiros de diferentes famílias (Zargar *et al*, 2012), sendo a sua incidência e severidade dos danos influenciada pelo tamanho e dieta do hospedeiro, zona geográfica, número e mobilidade dos parasitas e do seu modo de fixação (Igeh & Avenant-Oldewage, 2020; Reverter *et al*, 2016).

A transmissão acontece, essencialmente, devido às densidades de cultivo, onde as taxas de contacto são maiores quanto maior for a densidade da população, mas também é influenciada pela suscetibilidade do hospedeiro quando essas taxas são constantes (Johnson *et al*, 2011). As *oncomiracidia* manifestam movimentos rápidos, apresentando comportamentos de fototaxia, geotaxia, reotaxia e quimiotaxia (Hoai, 2020), que ajudam na procura ativa do hospedeiro em distâncias curtas, enquanto que os monogêneos vivíparos exibem mecanismos de transmissão devido ao seu sistema nervoso. Em todos os casos, expõem vários *sensilla* dispersos pelas diferentes zonas do corpo, detetando sinais químicos emitidos pelo hospedeiro (Buchmann &

Lindenstrom, 2002). Outra estratégia que estes parasitas utilizam são os ritmos de eclosão dos ovos, onde as larvas emergem durante um período específico através de pulsos, não eclodindo continuamente, correspondendo geralmente à altura em que o hospedeiro se encontra inativo, havendo evidências que ocorrem eclosões massivas durante o dia/noite, embora, por vezes possam acontecer de forma espontânea (Whittington & Kearn, 2011).

Para além das espécies de monogéneos já conhecidas, ainda existem cerca de 25 000 espécies não identificadas, sendo que este é um grupo bastante diversificado morfológicamente e que teve uma grande evolução nos órgãos anexos ao longo dos anos. Órgãos esses que, geralmente, são utilizados para identificar a espécie em questão como outras características: (1) – Modo de fixação nos diferentes órgãos do hospedeiro; (2) – Forma e tamanho do corpo e do haptor; (3) – Estrutura da extremidade anterior, presença ou ausência de lóbulos, abas, ventosas e o seu número; (4) – Estrutura do tegumento, como a sua largura e presença/ausência de dobras, escamas ou espinhos; (5) – Presença/ausência de olhos e a sua quantidade; (6) – Estruturas quitinosas do haptor; (7) – Forma, número, orientação e organização das estruturas do haptor; (8) – Estrutura e tamanho do órgão copulatório; (9) – Estrutura intestinal; (10) – Número de testículos; (11) – Forma e organização do ovário; (12) – Correlação do tamanho dos ovários e dos testículos; (13) – Número, forma e situação do reservatório das glândulas do órgão copulatório; (14) – Forma da vesícula seminal; (15) – Posição dos poros genitais, curso e armamento do ducto vaginal e do receptáculo seminal, se presente; (16) – Espécie e idade do hospedeiro e localização onde o parasita se encontra no hospedeiro (Pugachev *et al*, 2010). Porém a semelhança das estruturas é um dos principais problemas a nível morfológico, isto porque a distinção entre os monogéneos se torna difícil de identificar (Vignon, 2011), podendo levar a uma incorreta caracterização taxonómica (Poulin & Leung, 2010). Essa semelhança entre as diferentes espécies pode ser explicada pela herança de um antepassado comum ou pela convergência da forma durante a evolução em resposta às pressões ecológicas, adaptativas, funcionais ou devido a um desenvolvimento equiparável (Rodríguez-González *et al*, 2017). Por conseguinte, a filogenia vem tornar a identificação mais fiável e de certa forma mais rápida, complementando com as características morfológicas, facilitando a identificação inequívoca ou o surgimento de novas espécies em resultado da evolução, providenciando um diagnóstico e controlo de doenças instantaneamente (Hansen *et al*, 2007). As técnicas moleculares são extremamente sensíveis para a deteção de surtos de doenças o que providencia um diagnóstico e controlo, instantaneamente, nas aquaculturas. Uma das técnicas que é, frequentemente, usada é a reação em cadeia de polimerase (PCR) que permite a amplificação de milhões de cópias de uma região específica de DNA, utilizando uma série de ciclos de temperaturas repetidos,

geralmente entre 20 a 40 vezes. Cada PCR inclui três passos essenciais: Desnaturação - através do calor; Emparelhamento – os *primers* ligam-se nas suas regiões complementares da cadeia de DNA alvo; e a Extensão - a enzima polimerase termoestável catalisa a adição dos nucleótidos no final de cada *primer*; criando, assim, novas cópias da região alvo em cada ciclo (Qua et al, 2018). Esse produto final de DNA, é processado seguidamente, pela técnica de eletroforese, utilizando um gel de agarose, constituído por diversos poros que permitem separar as moléculas com base na carga, tamanho e forma. Quanto maior for a concentração do gel mais pequenos serão os poros. Juntamente à agarose é utilizado um corante que permite a visualização do DNA à luz ultra-violeta (UV), nomeadamente brometo de etídio, GreenSafe, SYBR Green, violeta de cristal, azul metil, entre outros. Com o auxílio da corrente elétrica, a molécula de DNA, carregada negativamente, migra em direção ao ânodo, com carga positiva, possibilitando a separação por tamanhos. O tampão que é colocado na tina serve como condutor de eletricidade e controla, devidamente, o pH que é extremamente importante para a carga e confere a estabilidade das moléculas. Os tamanhos exatos da separação do DNA são determinados em função da distância percorrida por cada banda, comprando com uma escala com tamanho de fragmentos já conhecidos permitindo identificar a espécie em causa (Lee *et al*, 2012; (Tankeshwar, 2021).

1.3. Corvina

A aquacultura marinha do Mediterrâneo é predominantemente dominada pelo robalo, *Dicentrarchus labrax*, e pela dourada, *Sparus aurata*. Como consequência, a procura de espécies promissoras, para uma maior diversificação, tem aumentado (Suzer *et al*, 2012). Uma dessas espécies é a corvina, *Argyrosomus regius*, onde a sua produção terá sido iniciada no ano 1990 em França e Itália, seguindo-se de Espanha, Portugal e Grécia (Santos *et al*, 2018). Embora o seu cultivo ser bastante limitado à bacia do Mediterrâneo (Stipa & Angelini, 2005), esta teve um aumento de 2 000 a 15 000 toneladas até ao ano 2015 (de Sousa, 2017). As elevadas taxas de crescimento ($\approx 1\text{Kg/ano}$) (Cardeira *et al*, 2012) e de fecundidade (Saavedra *et al*, 2018), as baixas taxas de conversão alimentar (Papadakis *et al*, 2018), o rápido desenvolvimento larvar e sendo uma espécie euritérmica (Fountoulaki *et al*, 2017), ou seja, com grande capacidade de tolerar uma vasta gama de salinidades (5–39 ‰) e temperaturas (13–28°C), permitem com que esta seja uma ótima candidata à aquacultura pela sua fácil domesticação. Possui um elevado valor comercial, que pode variar entre os 6 a 12 €/Kg (Zupa *et al*, 2020) devido à grande qualidade que a carne apresenta. Embora, o seu cultivo seja bastante recente, a corvina é produzida em diversos sistemas como em tanques de terra, jaulas ou até mesmo em instalações intensivas (Millán-Cubillo *et al*, 2016).

De nome comum corvina-legítima, *A. regius* pertencente à família Sciaenidae, encontrando-se distribuída ao longo da costa Atlântica, no Mar Mediterrâneo, em zonas estuarinas e fundos arenosos (Arechavala-Lopez *et al*, 2015), podendo ser localizada em profundidades entre os 15 e os 300 metros. Pode atingir um comprimento total de 180 cm, 50 kg de peso corporal e chegar a uma idade máxima de 42 anos (Morales-Nin *et al*, 2012), qualificando-se como um predador de topo, com comportamento voraz (Gil *et al*, 2013). Os juvenis alimentam-se de pequenos peixes demersais e crustáceos enquanto que os animais maiores consomem, preferencialmente, peixes pelágicos e cefalópodes (Kružić *et al*, 2016).

Com coloração cinzento-prateado e tons bronze, o corpo encontra-se coberto por escamas ctenoides. Este espécime detém uma cabeça relativamente grande e olhos pequenos, com forma corporal fusiforme, alongado e esguio, que expõem uma ligeira compressão lateral. A linha lateral é evidente e este peixe possui duas barbatanas dorsais, uma barbatana anal curta e uma barbatana caudal truncada em forma de S (FAO, 2005-2021; Gil Oviedo, 2019).

A família Sciaenidae pode ser classificada como peixes roncadores devido à sua habilidade de produzir sons emitidos pela vibração da musculatura da bexiga-natatória associados à musculatura lateral (Amoedo, 2012) e essas vocalizações têm o potencial de transportar informação à cerca da espécie, tamanho, sexo, ontogenia e está relacionado com a época reprodutiva (Pereira *et al*, 2020). *A. regius* é uma espécie gonocórica anádroma, pois migra em direção aos estuários em março para desovar, onde permanece até ao final do verão (Morales-Nin *et al*, 2012). As larvas mantêm-se nos estuários até serem juvenis e regressam a estes quando a sua maturação sexual é atingida (Vallés, 2013). Geralmente, as corvinas selvagens atingem a sua maturação sexual quando o seu comprimento total é de 45-62 cm em machos e 47-70 cm nas fêmeas, contrariamente aos indivíduos em cativeiro que a alcançam mais cedo, 27 cm nos machos e 36 cm nas fêmeas (Mylonas *et al*, 2013). Estas diferenças de tamanho e idade a que a primeira maturação sexual acontece é afetado pelas densidades de stock, alimentação e temperatura da água que no caso da aquacultura são controlados (Gil *et al*, 2013).

Um dos requisitos para a introdução de novas espécies em aquacultura é o conhecimento de problemas patológicos que possam vir a surgir (Tsertou *et al*, 2018). Apesar da produção de corvina em aquacultura ser menos suscetível a doenças, comparando com outras espécies, o crescimento em elevadas densidades e o manuseamento inadequado podem provocar stress no peixe, tendo efeito direto na sua imunocompetência, resultando em infeções agressivas. Deste modo, essa fraca capacidade de resistir a doenças pode auxiliar na ocorrência de diversos parasitas (Andree *et al*, 2015), nomeadamente de monogéneos (Tabela 1-I), bem como de

Amyloodinium ocellatum. Em consequência, da ocorrência da grande intensidade de parasitas nas brânquias, existe uma maior facilidade para originar infecções bacterianas secundárias, tais como *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela*, *Mycobacterium marinum* e *Nocardia* ou, ainda, o aparecimento de vírus, em particular o nodavírus. Outras doenças não infecciosas podem aparecer, como por exemplo a granulomatose ou a dermatia erosiva crônica, neoplasia ou problemas no esqueleto do peixe (Soares *et al*, 2018).

Tabela 1-I - Monogêneos comuns em aquaculturas de *Argyrosomus regius*

Família	Espécie	Órgão Afetado	Autor
Calceostomatidae	<i>Calceostoma calceostoma</i>	Brânquias	Kearn, 2004; Arafa <i>et al</i> , 2009; Samak & Said, 2008;
	<i>Calceostoma polyorchis</i>	Brânquias	Mak, 2001
	<i>Ktariella polyorchis</i>	Brânquias	Vala & Euzet, 1977
Capsalidae	<i>Benedenia sciaenae</i>	Pele	Hayward <i>et al</i> , 2007; Toksen & Bresciani, 2007
Diplectanidae	<i>Diplectanum sp.</i>	Brânquias	Eissa <i>et al</i> , 2016;
	<i>Diplectanum sciaenae</i>	Brânquias	Katharios, 2018; Andree <i>et al</i> , 2015
Microcotylidae	<i>Microcotyle pancerii</i>	Brânquias	Quilichini <i>et al</i> , 2009;
	<i>Sciaenacotyle pancerii</i>	Brânquias e Pele	Merella <i>et al</i> , 2009; Merella <i>et al</i> , 2015

2. Objetivos

Este ensaio experimental teve como principal objetivo caracterizar o ciclo de vida do parasita monogêneo *C. glandulosum* morfológica e filogeneticamente, recorrente em *A. regius*. Do mesmo modo, pretende-se entender se este parasita é específico de uma única espécie de peixe ou de mais, verificando a existência de ovos nos tanques de *A. regius* e nos tanques com outras espécies separadamente, nomeadamente *Sparus aurata*, *Diplodus sargus* e em *Seriola dumerili*.

Pretendeu-se, ainda, averiguar qual o melhor substrato para a deposição dos ovos do parasita e quais as temperaturas ótimas de cultivo *in vitro*.

Por último, foram testadas várias técnicas para a eliminação de *C. glandulosum* das brânquias da corvina, com o intuito de estabelecer protocolos de trabalho para técnicas laboratoriais.

3. Materiais e Métodos

Os ensaios experimentais foram realizados nas instalações da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPPO), infraestrutura pertencente ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), onde se realiza investigação, desenvolvimento e demonstrações experimentais à escala piloto, num período compreendido entre o dia 6 de outubro de 2020 e o dia 3 de junho de 2021.

Num ensaio preliminar, com o objetivo de verificar quais as espécies de monogéneos que poderiam ser encontradas em *A. regius*, foram recolhidos diferentes ovos, através da colocação de 4 fios de algodão nos tanques com 30 cm cada, na zona de saída de água. Para o processo de identificação dos ovos recolhidos, recorreu-se a Kearn (1986), onde descreve a morfologia de alguns ovos de diversas espécies da classe Monogenea.

3.1. Caracterização das diferentes fases de vida de *Calceostoma glandulosum*

Para a caracterização do ciclo de vida do parasita *C. glandulosum* foram estudadas as seguintes fases: ovos, larva (*oncomiracidium*) e o organismo adulto.

3.1.1. Recolha de ovos

A recolha de ovos de monogéneos ocorreu nos tanques de reprodutores (R) de corvinas, R3, R7 e R8. Tanto em R3 como em R7 o número de indivíduos era seis, cujas densidades correspondiam 5,34 Kg/m³ e 5,1 Kg/m³ respetivamente. No que diz respeito a R8, este possuía 7 indivíduos, correspondendo a uma densidade de 3,87 Kg/m³ (Tabela 3-I).

Tabela 3-I - Descrição do número de indivíduos (Nº Ind.), do peso médio (P. Médio), do comprimento total médio (CT Médio) e da densidade de *Argyrosomus regius* presentes nos tanques dos reprodutores (R), R3, R7 e R8. Os valores do peso e do comprimento médio são apresentados como o valor médio dos pesos/comprimento mais ou menos o desvio padrão

Tanque	Nº Ind.	P. Médio (Kg)	CT Médio (cm)	Densidade (Kg/m ³)	Dimensão Tanque (m ³)
R3	6	7,3 ± 1,44	85,75 ± 4,64	5,34	9
R7	6	7 ± 0,87	85,33 ± 1,34	5,10	9
R8	7	6,8 ± 0,81	84,12 ± 3,96	3,87	11

Nos tanques de terra (T), cujo volume é de 2 500 m³, onde uma variedade de espécies se encontra na fase de engorda, em policultivo semi-intensivo, foram recolhidos ovos dos tanques T2 e T5 (Tabela 3-II).

Tabela 3-II - Descrição do número de indivíduos (Nº Ind) e da densidade das diferentes espécies de peixes marinhos nos tanques de terra (T) T2 e T5

Espécie	T2		T5	
	Nº Ind.	Densidade (Kg/m3)	Nº Ind	Densidade (Kg/m3)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	500	0,14	2972	0,05
<i>Sparus aurata</i>	899	0,16	392	0,05
<i>Diplodus sargus</i>	494	0,05	-	-
<i>Argyrosomus regius</i>	991	0,26	3348	0,01
<i>Diplodus cervinus</i>	197	0,02	-	-

Os fios de algodão que foram colocados nas saídas de água de cada tanque (Tabela 3-II e 3-III), foram retirados ao fim de cinco dias e transferidos para frascos de vidro com água salgada filtrada por um filtro de areia e esterilizada em lâmpada ultravioleta (UV), para conservar as amostras. Em seguida, estas foram levadas para o laboratório, onde foram observadas detalhadamente à lupa eletrônica, Nikon SMZ1000, registrando os ovos fotograficamente. A sua caracterização baseou-se essencialmente na estrutura exterior, coloração e pela determinação das suas dimensões, nas quais foram medidos 36 ovos, através da escala da lupa, a altura do ovo e o filamento, desde a sua extremidade à zona de onde este se inicia (Figura 3.1). O desenvolvimento do embrião também foi estudado, classificando os ovos em quatro fases de acordo com Militz *et al* (2014).

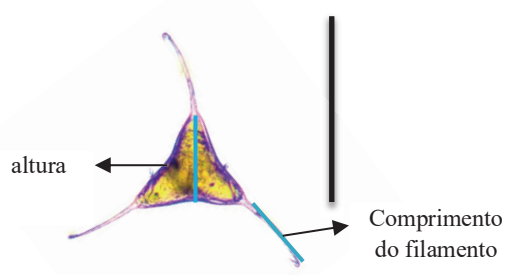


Figura 3.1 - Representação esquemática da determinação das dimensões dos ovos de *Calceostoma glandulosum*. Escala: 100 µm. Original do autor

3.1.2. Larva (*Oncomiracidium*)

De maneira a conhecer e caracterizar as formas larvares - *oncomiracidia*, todos ovos que apresentavam a *oncomiracidium* com os opérculos oculares desenvolvidos, visíveis no algodão,

eram retirados com uma agulha e transferidos para uma placa de Petri, para serem triados e limpos de todos os detritos, evitando assim a contaminação da cultura por outros microrganismos. A água que conservava as amostras foi, também, filtrada, para que não se perdesse nenhum ovo, através de uma malha de 200 μm , impedindo a passagem dos resíduos de maiores dimensões e, por fim, uma malha de 55 μm para reter os restantes ovos, dado que o tamanho total destes poderia atingir 133 μm . Estes procedimentos foram efetuados com bastante rigor para que nenhum ovo se danificasse ou para evitar a sua eclosão.

Após a obtenção de todos os ovos, estes foram transferidos para placas de incubação com seis poços, formando um stock de 100 larvas, colocando 10 ovos em 3ml de água salgada filtrada e passada por lâmpada UV, sendo trocada diariamente em cerca de 1/3, sem perturbar os ovos ali presentes. As placas foram incubadas à temperatura ambiente e com fotoperíodo 12:12 (dia/noite), sendo observadas diariamente à mesma hora. No total, 31 larvas eclodiram e foram retiradas de cada poço com uma pipeta de Pasteur, transferindo-as para uma lâmina com cavidade e observadas ao microscópio ótico, Nikon ECLIPSE Ci, após a adição de uma gota de formol (A. M. C. Cruz, Portugal) a 33% para imobilizar as *oncomiracidia* (Hirazawa *et al*, 2010).

Com o intuito de determinar o tempo de vida das larvas fora do hospedeiro após a eclosão, foram realizados novos lotes, depositando uma larva individualmente em cada poço de uma placa de 24 poços, com água salgada filtrada com filtro de areia e seguido para filtro de UV. O cultivo decorreu a uma temperatura ambiente de 23°C e fotoperíodo de 12:12 (dia/noite). Os ovos foram colocados a eclodir durante a manhã, e observados após 24 horas, assumindo que todas as larvas que teriam eclodido até àquela hora seria o tempo 0 de sobrevivência. Essas larvas eram transferidas para uma placa de Petri, com água salgada filtrada, com a indicação da hora que estas teriam nascido, registando o número de horas, até à sua morte (que se observava quando as larvas não apresentavam movimento ou estavam a degradar-se).

Para a determinação da fecundidade de *C. glandulosum*, foram usadas seis corvinas do tanque de terra com peso médio de $86,3 \pm 16,6$ g e comprimento total médio de $22,2 \pm 1,5$ cm, transferidas seguidamente para um balde de volume 20 L, com 15L de água salgada (Figura 3.2) onde se adicionou 150 ppm de peróxido de hidrogénio (José M. Vaz Pereira S. A., Portugal) durante 30 minutos, permitindo a eliminação de quaisquer parasitas presentes nas brânquias e pele. Os peixes foram transferidos individualmente para tanques com 15L de água salgada a uma temperatura entre os $22 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 3.2 - Baldes de infecção para determinar a fecundidade e maturação sexual de *Calceostoma glandulosum* em *Argyrosomus regius*. Original do autor

O ensaio de infecção com o objetivo de determinar a fecundidade do parasita baseou-se no protocolo de Hoai & Hutson (2014). Primeiramente foi necessário diminuir o volume da água do tanque em cerca de 1/3, introduzindo apenas uma *oncomiracidium* em cada tanque, retirando o arejamento durante 1 hora para que a infecção ocorresse com sucesso. Passado esse tempo, o volume de água foi repostado e o arejamento ligado novamente.

A determinação da fecundidade da espécie de *C. glandulosum* foi monitorizada pela produção de ovos a cada 24 horas. Por conseguinte, a água de cada tanque era filtrada na sua totalidade, posteriormente aos peixes serem transferidos para outros tanques com água salgada limpa filtrada em UV à mesma temperatura. A filtração da água foi executada através da passagem por duas malhas, construídas em tubos que se inseriam dentro um do outro, sendo que a primeira passagem era na malha de 125 μm , para reter toda a matéria orgânica de partículas maiores permitindo a passagem dos ovos, ficando retidos na segunda malha de 55 μm (Figura 3.3). Em seguida, essa malha foi lavada para outra de 55 μm , construída num tubo mais pequeno para que fosse possível a sua observação à lupa, Nikon SMZ1000 (Figura 3.4).

Os monogéneos atingem a sua maturação sexual quando iniciam a produção de ovos, acabando por ser libertados na coluna de água (Brazenor *et al*, 2018). Assim, quando ocorreu o aparecimento dos primeiros ovos de *C. glandulosum* assumiu-se que a maturação sexual foi atingida, sendo monitorizada a ocorrência de ovos a cada 24 horas, repetindo o mesmo processo. O ensaio terminou após dois dias consecutivos sem o aparecimento de ovos.



Figura 3.3 - Tubos com malha de 55 μm à esquerda e 125 μm à direita. Original do autor

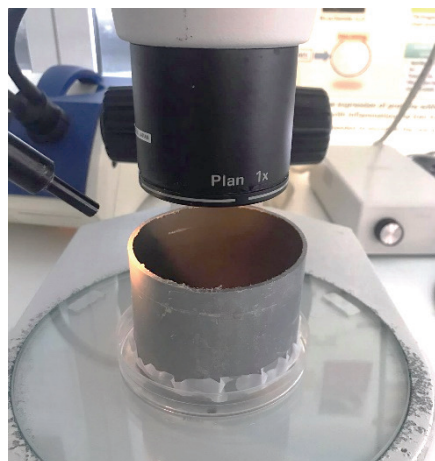


Figura 3.4 - Malha de 50 μm para observar os ovos de *Calceostoma glandulosum* após filtração à lupa, Nikon SMZ1000. Original do autor

3.1.3. Organismo Adulto

Para a observação do organismo na fase adulta, seis corvinas foram recolhidas do tanque T2 cujo peso médio foi de $444 \pm 179,7$ g e comprimento total médio de $36,9 \pm 7,3$ cm, sendo levadas para o laboratório de patologia onde se procedeu à análise das brânquias.

Primeiramente, os animais foram sacrificados através de uma incisão realizada na espinha e os dois primeiros arcos branquiais foram retirados, de ambos os lados. Para uma melhor deteção dos monogéneos, os epitélios branquiais foram separados do arco branquial e observados ao microscópio ótico, Nikon ECLIPSE Ci. Foi feito um registo fotográfico de oito *C. glandulosum* de forma a proceder às medições da sua dimensão e a diferenciar as suas estruturas

3.2. Identificação Filogenética

Para a identificação molecular utilizou-se o parasita adulto retirado das brânquias de *A. regius* e os ovos tetraédricos recolhidos com o substrato algodão, colocando-os a eclodir durante 24 horas a 23°C. Ambas as amostras foram colocadas num eppendorf de 1,5ml com etanol a 70% e armazenados a 4°C.

A extração do ADN (Ácido Desoxirribonucleico) genómico foi realizado utilizando o Kit NZY Tissue gDNA isolation (Nzytech, Portugal) de acordo com o protocolo do fornecedor, com uma alteração no final, no qual o tampão de eluição (NE) foi aquecido a 50°C antes de ser adicionado à coluna. Para a eluição da amostra, 100 μl de tampão foi adicionado, aguardando durante 1 minuto antes de centrifugar na centrífuga MPW-150R. Centrifugou-se por 2 minutos a 11 000 x g e voltou-se a eluir com os mesmos 100 μl de tampão. No final, quantificou-se a concentração de ADN de cadeia dupla por espectrofotometria utilizando um espectrofotómetro, DeNovix DS-11 FX.

A sequência genômica de *C. glandulosum*, descrita por Hayward *et al* (2007), foi verificada no BLAST do GenBank e a partir desta foi possível desenhar os *primers* no Primer-BLAST, dando origem a CGla_ITS2_Fw1 (5'-GGTTGTGGATTGGACTGTAT-3') e a CGla_ITS2_Rv1 (5'-GCACACAACAGAAACAATGA-3'). O PCR foi executado, iniciando-se pela preparação da solução MasterMix, onde num eppendorf de 1,5 ml foram colocados, por cada amostra a testar, 27,6 µl de H₂O purificada (MiliQ), 5 µl de Buffer 10x, 2,5 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTP's, 1,25 µl de CGla_ITS2_Fw1, 1,25 µl de CGla_ITS2_Rv1 e 0,4 µl de Supreme NZYTaQ II (5 U/µL). Em cada eppendorf de 0,2 ml foram colocados 40 µl de MasterMix e adicionado 10µl de amostra respectivamente. O controlo negativo foi efetuado de igual forma à exceção da amostra que foi substituída por H₂O MiliQ. Os tubos foram dispostos no termociclador, Biometra® Personal Cycler e o programa foi iniciado pela desnaturação do DNA durante 3 min a 94°C, seguindo de 40 ciclos de amplificação 94°C durante 30 s, 30 s a 50°C e 72°C durante 2 min, finalizando com a extensão a uma temperatura de 72°C durante 10 min. Os produtos de PCR foram corridos, por eletroforese, em gel de agarose a 1,5% durante 1 hora a 120 V.

3.3. Ensaio 1 – Efeito de diferentes substratos na ocorrência de ovos de *Calceostoma glandulosum*

Diversos substratos foram testados como forma de avaliar qual o que mais se adequava à fixação de um maior número de ovos, utilizando materiais como fios de algodão, cordas de nylon e plástico de dois tipos diferentes, polipropileno e poliestireno (Figura 3.5). Num período de cinco dias foram dispostos, em cada tanque, seis fios de algodão, um círculo de plástico poliestireno e seis pedaços de plástico polipropileno. Nos tanques de terra foi necessário utilizar-se uma estrutura de rede de plástico com malha 3x3 cm construída por Dias (2020) num estudo realizado anteriormente nas instalações da EPPO (Figura 3.6). Essa estrutura envolvia uma tira de esferovite que, para além de suportar todos os materiais e separá-los devidamente, permitiu também a proteção de quaisquer agressões por parte do meio, essencialmente impedindo que os peixes os destruíssem. A temperatura foi registada diariamente durante os cinco dias em que os substratos estiveram na água. Depois desse período, as armadilhas foram retiradas e colocadas em água salgada, para conservação das amostras e levados para o laboratório, onde foram contados o número de ovos presentes em cada substrato, à lupa binocular. Os resultados foram apresentados em número de ovos por cm por dia.

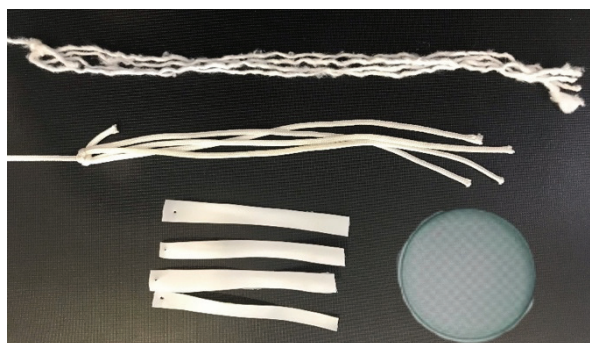


Figura 3.5 - Substratos testados para fixação de ovos de monogéneos (algodão, corda, plástico poliestireno e plástico polipropileno). Original do autor



Figura 3.6 - Estrutura utilizada para proteger os diferentes substratos de fixação de ovos, instalada na comporta de saída de água dos tanques de terra. Original do autor

3.4. Ensaio 2 – Efeito da temperatura nos ovos de *Calceostoma glandulosum*

O ensaio prático realizado na EPPO abrangeu as quatro estações do ano, o que permitiu acompanhar as alterações sazonais da temperatura da água. Foram 6 temperaturas, 13°C, 14°C, 16°C, 17°C, 22°C e 24°C para estudar o ciclo de vida do parasita e a produção de ovos em função da temperatura. Recorreu-se ao mesmo método de recolha descrito em “3.1.1 – Recolha de ovos”, procedendo-se à contagem total de ovos.

A viabilidade dos ovos também foi determinada às diferentes temperaturas, desta forma os ovos que se fixaram no algodão, recolhidos nos mesmos tanques de reprodutores a uma temperatura de 14°C, 16°C e 17°C, foram contados e classificados segundo Militz *et al* (2014), em quatro fases distintas: Fase I – ovos inviáveis que apresentam uma cor translúcida ou se encontram danificados; Fase II – coloração castanho opaca pela presença da *oncomiracidium*; Fase III – *oncomiracidium* com os pontos oculares bem desenvolvidos; e a Fase IV – exibem cor translúcida e com o opérculo do ovo aberto.

Para entender qual a melhor temperatura para a incubação *in vitro*, ou seja, que permitia uma rápida eclosão, estes após a recolha dos substratos foram triados e colocados em 3ml de

água salgada filtrada em UV nas placas de seis poços, formando um stock de 100 larvas, como referido anteriormente. A incubação dos ovos foi mantida durante 48 horas no laboratório com temperaturas controladas, nomeadamente a 17°C, 19°C, 21°C, 23°C e 25°C, estando expostas a um fotoperíodo de 12:12 (dia/noite) e as trocas de água eram realizadas diariamente em cerca de 1/3 do volume para que o oxigénio se mantivesse a níveis adequados.

Os ovos foram examinados após 24 horas de incubação e todas as larvas que nadavam livremente teriam eclodido naquele momento, assumindo que seria o tempo 0 e depois só eram observadas, novamente, após 48 horas da sua eclosão. O sucesso da eclosão foi determinado através da taxa de eclosão (N° de ovos eclodidos/ N° ovos colocados a incubar x 100).

3.5. Ensaio 3 - Especificidade de *Calceostoma glandulosum*

Nos tanques de reprodutores (Tabela 3 – III) foram colocados seis fios de algodão com 30 cm cada. Após cinco dias, as armadilhas foram retiradas de cada um dos tanques, preservadas em água salgada filtrada e posteriormente contado o número de ovos à lupa, apresentando os resultados sob a forma de número médio de ovos/cm/dia. A temperatura foi registada durante este período em que os substratos estiveram na água.

Tabela 3-III - Número de indivíduos das diversas espécies presentes nos tanques de reprodutores (R)

Tanque	Espécie	Nº Indivíduos
R1	<i>Sparus aurata</i>	10
R3	<i>Argyrosomus regius</i>	6
R4	<i>Diplodus sargus</i>	27
R5	<i>Seriola rivoliana</i>	4
R7	<i>Argyrosomus regius</i>	6
R8	<i>Argyrosomus regius</i>	7

Por outro lado, várias amostragens patológicas foram efetuadas nos tanques de terra, com o objetivo de verificar a existência de parasitas externos nos peixes. Assim, recorrentemente, recolhiam-se 3 a 4 espécies de peixe de cada tanque, transferindo para o laboratório para serem analisadas. Primeiramente os peixes eram sacrificados por uma incisão na coluna e as brânquias retiradas para serem observadas ao microscópio. A espécie e a intensidade do parasita foram registadas, sendo que a intensidade se verifica pelo número de parasitas existente nos dois primeiros arcos branquiais de cada hospedeiro (Bush *et al*, 1997).

3.6. Ensaio 4 – Teste de diferentes produtos na eliminação do parasita *Calceostoma glandulosum* das brânquias de *Argyrosomus regius* em laboratório

Com o objetivo de ter peixes provenientes da engorda em tanques de terra isentos de parasitas branquiais para fazer os ensaios de fecundidade do parasita *Calceostoma glandulosum*, foram testados diversos produtos.

Em ensaios anteriores (na caracterização da fecundidade de *C. glandulosum*) as corvinas foram expostas a um banho com peróxido de hidrogénio (José M. Vaz Pereira S. A., Portugal) a 150 ppm durante 30 minutos. Todavia, ainda era possível visualizar ovos de monogéneos, incluindo *C. glandulosum*, nas malhas durante as 24 horas seguintes aos peixes serem infetados, verificando que este não seria a melhor maneira de erradicar os parasitas. Desta forma, foram testados alguns tratamentos, como formol - formaldeído a ~ 37 % e por metanol $\leq 10\%$ (A. M. C. Cruz, Portugal), numa concentração de 200 ppm e a 300 ppm, água doce e 2-fenoxietanol (Applichen, Espanha) a 150 ppm, para verificar qual o que apresentava maior sucesso na remoção na íntegra dos parasitas presentes nas brânquias.

Nos tratamentos de formol foram utilizados quatro peixes para cada concentração a ser testada (Figura 3.7), enquanto que para os restantes apenas se utilizou um peixe para cada tratamento.

Inicialmente *A. regius*, com peso médio de $86,3 \pm 16,6$ g e comprimento total médio de $22,2 \pm 1,5$ cm, foram deixados durante 24 horas nos tanques, devidamente separados, para verificar se estavam infetados com monogéneos, isto é, se após a filtração da água do tanque existiam ovos presentes na malha.

Para os tratamentos com formol os peixes foram transferidos para baldes com 15 L de água, durante 1 hora, para a concentração de 200 ppm e 30 minutos quando expostos a 300 ppm de formol. Depois do período do banho, as corvinas foram transferidas, novamente, para os tanques com água salgada limpa e permaneceram até ao dia seguinte. Filtrou-se a água totalmente, de modo a verificar se ainda havia a presença e produção de ovos de monogéneos, onde eram contados diariamente, para entender se o procedimento estaria a ser eficaz e determinar a sua evolução ao longo do ensaio.

O processo de filtração da água foi idêntico nos outros tratamentos. Contudo, o que apenas diferenciou foi a forma como o tratamento era administrado. No banho de água doce o peixe era colocado em água com salinidade nula durante dois minutos e colocado novamente em água limpa e com arejamento. Por outro lado, o 2-fenoxietanol (Applichen, Espanha) foi utilizado

numa concentração de 125ppm em 10L de água salgada filtrada e o peixe permaneceu no banho de acordo com o seu comportamento de resposta a estímulos e pela perda da atividade natatória.

Os quatro tratamentos tornavam-se 100% eficazes se fossem eliminados por completo os parasitas presentes nas brânquias, terminando o ensaio quando não se verificava a produção de ovos de monogéneos nas 24 horas seguintes ao tratamento.



Figura 3.7 - Tanque de tratamento com formol em *Argyrosomus regius*. Original do autor

3.7. Análise Estatística

Para os dados da recolha de ovos de monogéneos em diferentes substratos foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com dois fatores de modo a examinar se ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os tanques onde os ovos foram recolhidos e o material utilizado. Os resultados da especificidade do hospedeiro de *C. glandulosum* também foram devidamente analisados por uma ANOVA com um fator, verificando se existiam diferenças estatisticamente significativas entre as variadas espécies de peixes e a fecundidade dos parasitas, respetivamente. Para tal, todos os pressupostos (homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados) foram devidamente validados com um nível de significância para $p < 0.05$. Quando foi observado a violação destes pressupostos, procedeu-se à comparação de médias, utilizando o teste de *Tukey*. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS 20.0 para o Windows.

4. Resultados

Nos tanques das corvinas, tanto nos de reprodutores como nos tanques de terra, foram observados ovos de Monogenea, nomeadamente *Diplectanum sp.* (Figura 4.1) e *C. glandulosum*. Estes eram morfologicamente distintos, dado que os ovos de *Diplectanum sp.* apresentavam uma forma ovoide composto, apenas, por um apêndice e com comprimento de 60 μm e largura de 30 μm e os de *C. glandulosum* exibiam um formato tetraédrico. Dada a falta

de informação sobre esta última espécie o foco principal do estudo foi o parasita *C. glandulosum*.

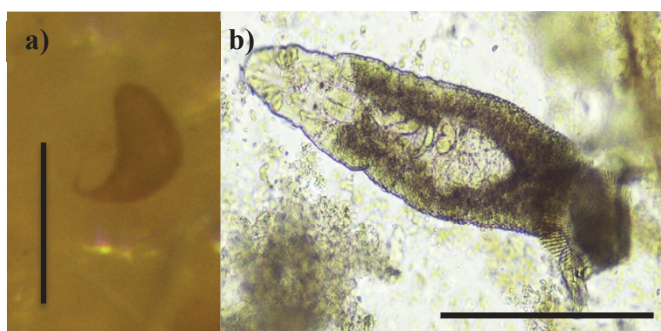


Figura 4.1 - a) ovo e b) indivíduo adulto de *Diplectanum sp.* encontrado nas brânquias de *Argyrosomus regius* visualizado ao microscópio ótico numa ampliação de 400x. Escala: 100µm. Original do autor.

4.1. Caracterização das diferentes fases de vida de *Calceostoma glandulosum*

C. glandulosum é um parasita da classe Monogenea, subclasse Monopisthocotylea, que apresenta um ciclo de vida direto, onde o organismo na sua fase adulta se fixa nas brânquias dos peixes, nomeadamente em *A. regius* e se alimenta do muco e células epiteliais. Este, quando atinge a maturação sexual, produz ovos que são libertados na coluna de água, podendo eclodir nesta, originando uma *oncomiracidium*. A larva, como apresenta uma natação veloz e com o auxílio do fluxo de água gerada pelas brânquias, vai fixar-se novamente a um novo hospedeiro, onde se vai desenvolver até à sua fase adulta e produzir ovos novamente, repetindo este ciclo continuamente (Figura 4.2).

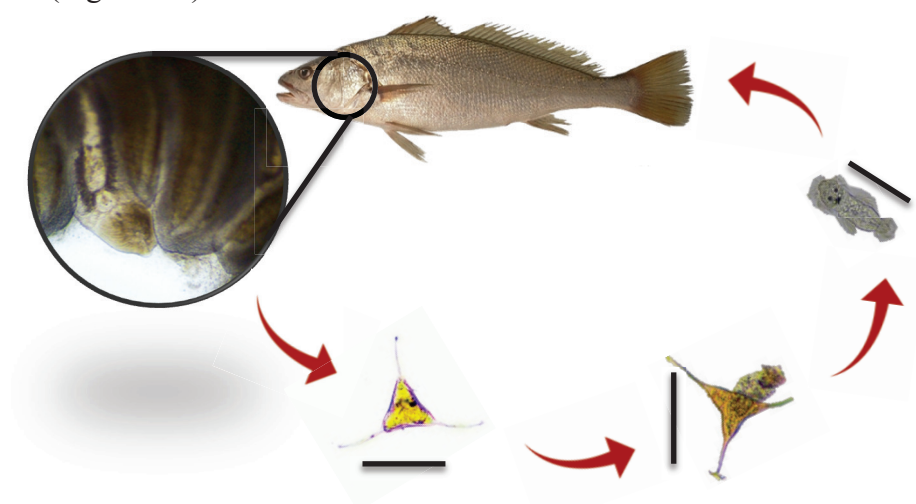


Figura 4.2 - Representação esquemática do ciclo de vida de *Calceostoma glandulosum*. Escala: 100µm (ovos e *oncomiracidium*); Ampliação de 100x do organismo adulto. Original do autor. Ilustração *Argyrosomus regius* retirado de: Meagre (*Argyrosomus regius*) – Akvatek Aquaculture Inc., n.d.)

4.1.1. Ovos

Os ovos de *C. glandulosum* possuíam uma forma tetraédrica, com cerca de $79 \pm 7 \mu\text{m}$ de cada lado e possuíam, em cada vértice, um filamento com comprimento médio de $54 \pm 6 \mu\text{m}$ que se arredondavam nas suas extremidades, à exceção de um que se apresentava em forma de “Y”. Num dos vértices, exibiam, ainda, um polo opercular que permite às larvas saírem do ovo (Figura 4.3).

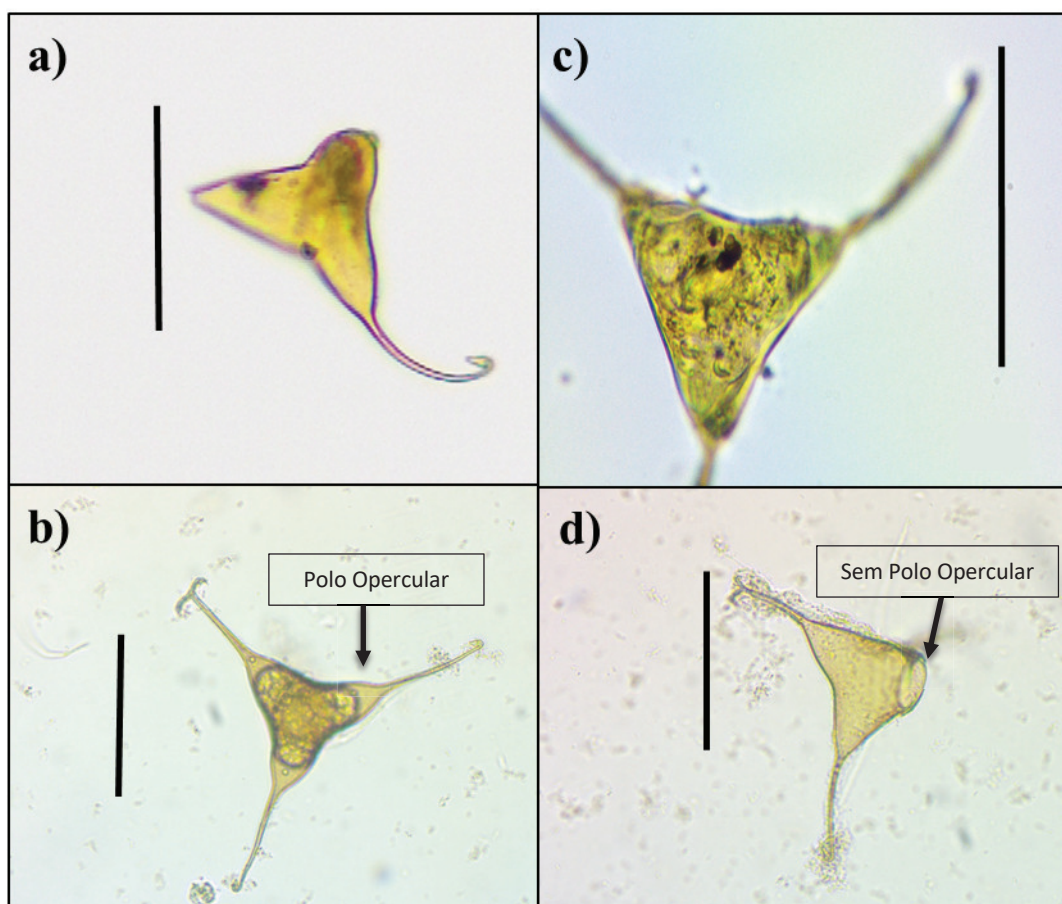


Figura 4.3 - Desenvolvimento do embrião de *Calceostoma glandulosum* dentro do ovo, classificado em quatro fases de desenvolvimento do embrião de: a) Fase I - Não embrionado/Danificado, com uma ampliação de 100x; b) Fase II - Embrionado, ampliando a 100x; c) Fase III - Em desenvolvimento, observado numa ampliação de 400x; Fase IV - Eclodido, utilizando uma ampliação de 100x. A escala representada na figura corresponde a 100 μm . Escala de 100 μm . Original do autor

4.1.2. Caracterização da *oncomiracidium* de *Calceostoma glandulosum*

A *oncomiracidium* de *C. glandulosum* exibia uma forma oval com um comprimento médio de $100 \pm 15 \mu\text{m}$ e largura de $37 \pm 9,3 \mu\text{m}$ e, geralmente, eclodem quando expostas a uma temperatura ótima após 24 horas, conseguindo sobreviver em média até $25,91 \pm 2,7$ horas fora do hospedeiro. Esta após a saída do ovo apresentava uma natação veloz ajudada pelas diversas *sensilla* dispostas nas zonas laterais do corpo e na zona posterior do mesmo. Na região cefálica estes organismos demonstravam quatro pontos oculares. Na zona contrária, no *haptor*, foi

possível a observação de dois ganchos *hamuliformes*, mas nenhum gancho marginal foi verificado ao microscópio ótico (Figura 4.4).

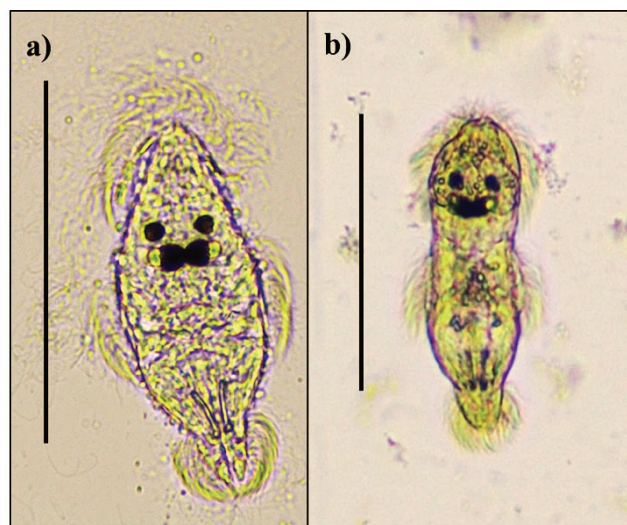


Figura 4.4 - *Oncomiracidium* do monogéneo *Calceostoma glandulosum*, observada com uma ampliação de a) 400x; b) 100x. Escala de 100 μ m. Original do autor

Após a infecção de *A. regius* com apenas uma *oncomiracidium*, verificou-se que *C. glandulosum* atingiram a maturação sexual entre os dias 11 e 14, correspondendo aos primeiros relatos de ovos na coluna de água. Este organismo, ao longo do ensaio, teve a capacidade de produzir uma quantidade crescente, alcançando um máximo ao dia 18 (287 ovos por peixe). Porém, essa competência de originar um grande número de ovos foi perdida em seguida, tendo um decréscimo até não conseguir produzir mais nenhum. Deste modo, o período de fecundidade tem uma duração média de 10 dias, dado que o último dia de produção de ovos ocorreu ao 24º dia (Figura 4.5).

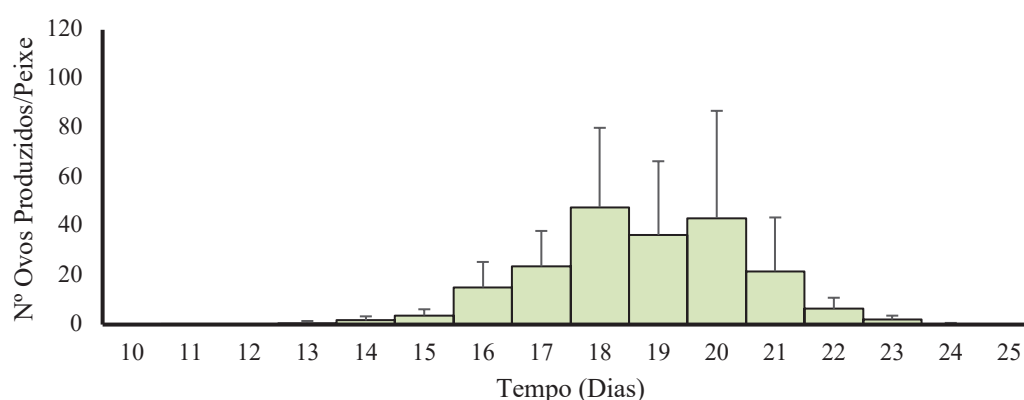


Figura 4.5 - Fecundidade de *Calceostoma glandulosum* após infecção de *Argyrosomus regius* com uma única *oncomiracidium*. (Até ao dia 14 o n=6, de 14 a 21 n=4; a partir do dia 22 n=3)

4.1.3. Caracterização de *Calceostoma glandulosum* na fase adulta

O número de monogéneos encontrados em corvina, variou entre 1 e 7 indivíduos por peixe, correspondendo a uma intensidade média de $4,5 \pm 2,3$ parasitas/peixe (Tabela 4-I).

Tabela 4-I - Intensidade (número de parasitas/hospedeiro) de *Calceostoma glandulosum* em *Argyrosomus regius* com os respetivos dados do peso, do comprimento total (CT) e do índice de condição (IC)

Peixe	Peso (g)	CT (cm)	IC	Intensidade
1	448	36	12,4	4
2	615	42	14,6	6
3	530	42,4	12,5	7
4	95	22,2	4,3	1
5	615	43,5	14,1	3
6	366	36,0	10,1	2

C. glandulosum na sua fase de adulto apresenta um comprimento médio de $2,1 \pm 0,8$ mm ($1,1 - 3,9$) e largura $0,44 \pm 0,2$ mm ($0,2 - 0,7$), sendo possível a sua visualização a olho nu. Junto da sua cavidade bucal existe uma aba com duas projeções glandulares redondas e a sua extremidade anterior, quando expandida demonstra uma lapela grande com as margens estriadas. O *haptor*, composto por dois pares de ganchos, encontra-se protegido por uma estrutura (Figura 4.6). Os ganchos marginais, o sistema digestivo e reprodutor, bem como outras estruturas não foram diferenciados.



Figura 4.6 - Visualização de *Calceostoma glandulosum* na fase adulta (esquerda) ao microscópio ótico numa ampliação de 40x, escala de 1mm e com destaque para o *haptor* (direita), observado a uma ampliação de 100x. Escala: 100µm. Original do autor.

4.2. Identificação Filogenética

Com extração de DNA obteve-se uma concentração de 114,478 ng/μl de *C. glandulosum* e rácio de A260/230 = 2,4 e A260/280 = 2,2. Após a amplificação do material genético por PCR, o fragmento foi observado, no gel, com um tamanho de 129 bp (Figura 4.7).

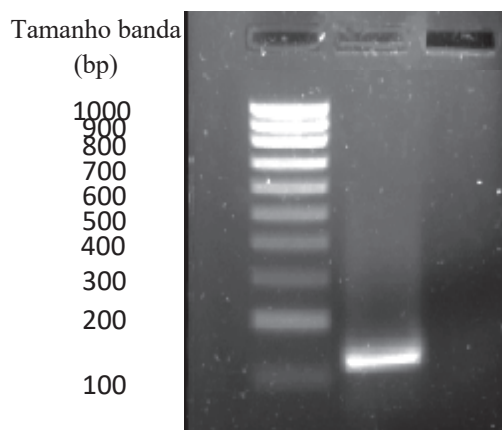


Figura 4.7 - Fragmento de DNA de *C. glandulosum* com um tamanho de 129 pb com a respetiva escala da *ladder* V do lado esquerdo.

4.3. Ensaio 1 – Efeito de diferentes substratos na ocorrência de ovos de *Calceostoma glandulosum*

O algodão exibiu uma maior adesão dos mesmos, sendo superior nos tanques R7 e R8 quando comparado com a corda, mas inferior no tanque R3. Já o substrato que apresentou os piores resultados foi o plástico do tipo poliestireno, não havendo quaisquer ovos, enquanto que no plástico do tipo polipropileno observaram-se alguns ovos, embora em número reduzido (Figura 4.8).

Segundo a análise estatística realizada através da ANOVA de dois fatores, verificou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas para o material de corda, com $p\text{-value} = 0,079$ ($>0,05$), contudo o mesmo não acontece no polipropileno ($p\text{-value} = 0,029$) nem no algodão ($p\text{-value} = 0,003$), pois o $p\text{-value}$ é inferior a 0,05 não cumprindo o requisito o que demonstrou a existência de diferenças entre estes dois materiais. Como o valor do poliestireno foi constante, dado que o seu $p\text{-value} = 1,0$, essa análise não foi realizada.

Por outro lado, quando comparado o fator tanque, estes manifestaram diferenças significativas visto que o requisito de significância não era cumprido (R3 – $p\text{-value} = 0,005$; R7 – $p\text{-value} = 0,005$; R8 – $p\text{-value} = 0,000$).

Através da realização do teste de *Tukey* as diferenças foram verificadas, nomeadamente na interação Material-Tanque, onde os pares “R3-R8” e “R7-R8”, relativamente ao material algodão exibiram diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, quando analisando a interação Tanque-Material os pares que mostraram maiores variâncias foram o “Poliestireno-Corda”, “Poliestireno-Algodão” no tanque R3, “Poliestireno-Corda”, “Poliestireno-Algodão”, “Polipropileno-Corda” e “Polipropileno-Algodão” e “Corda-Algodão” no tanque R8. O tanque R7 cumpre todos os requisitos em que $p\text{-value} > 0,05$.

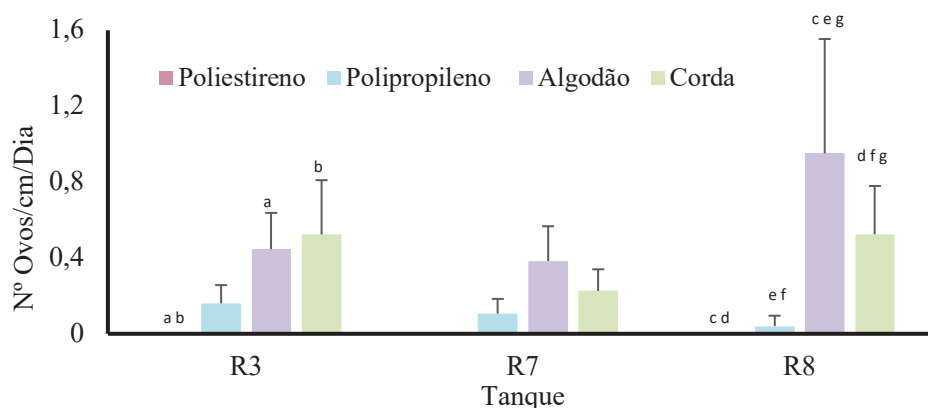


Figura 4.8 - Fixação de ovos de *Calceostoma glandulosum* em diferentes substratos: Poliestireno, Polipropileno, Algodão e Corda de Nylon; recolhido do tanque de reprodutores (R) de *Argyrosomus regius*: R3, R7 e R8, representado pela média do número de ovos por cm por dia. *a, b, c, d, e, f* e *g* representam os pares com diferenças estatisticamente significativas.

4.4. Ensaio 2 – Efeito da temperatura nos ovos de *Calceostoma glandulosum*

4.4.1. Ocorrência de ovos de *C. glandulosum*

Entre outubro de 2020 a janeiro de 2021, a ocorrência de ovos de *C. glandulosum* decresceu acompanhado pela diminuição da temperatura, ou seja, a uma temperatura inferior a 14°C a ocorrência de ovos foi inexistente. Com o aumento desta, a ocorrência de ovos tendeu a aumentar, atingindo o seu máximo a 20°C (produzindo 1,9 ovos/cm/dia). Porém, o aumento contínuo da temperatura a partir dos 20°C fez com que a ocorrência de ovos na água diminuísse (Figura 4.9).

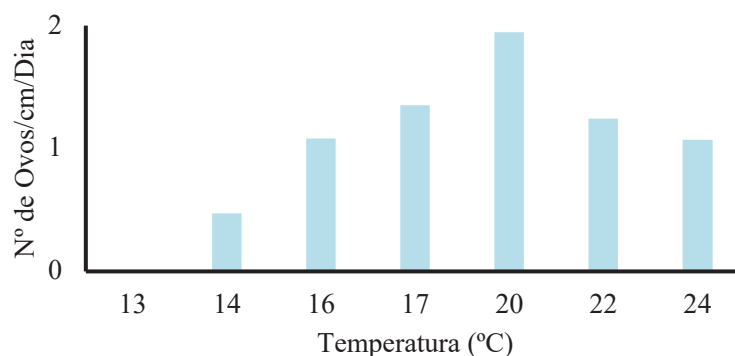


Figura 4.9 - Ocorrência de ovos de *Calceostoma glandulosum* nos tanques de reprodutores de *Argyrosomus regius* em função da temperatura.

4.4.2. Viabilidade dos ovos de *C. glandulosum*

Verificou-se que a temperatura da água não influenciou apenas a produção dos ovos de *C. glandulosum*, mas também a sua viabilidade (Figura 4.10), observando as quatro fases do desenvolvimento do embrião. De um modo geral, com a diminuição da temperatura a produção dos ovos teve um decréscimo significativo. Observou-se, igualmente, que a fase I apresentou um padrão comum, quanto menor foi a temperatura maior foi a produção de ovos. Na temperatura mais baixa, 14°C, a ocorrência de ovos eclodidos (fase IV) era praticamente inexistente (2%), aumentando a 16°C e seguidamente a 17°C. Os ovos que se encontravam embrionados ou em desenvolvimento (Fase II e III) tiveram o seu máximo à temperatura de 17°C (58%), diminuindo aos 16°C e por fim aos 14°C (Anexo II).

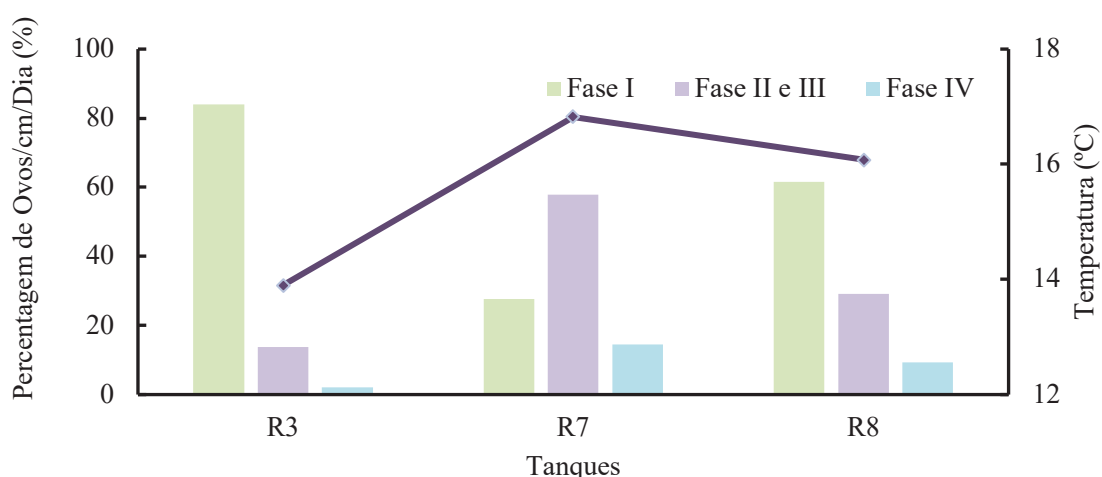


Figura 4.10 - Desenvolvimento do embrião dentro do ovo em função da temperatura, dividido por diferentes fases: Fase I – não embrionado; Fase II – embrionado; Fase III – em desenvolvimento; Fase IV - eclodido, recolhido nos tanques dos reprodutores de *Argyrosomus regius*: R3, R7, R8, correspondendo a temperaturas de 14°C, 17°C e 16°C, representado por número de ovos por cm por dia

4.4.3. Incubação de ovos

No geral, quanto maior era a temperatura maior era a taxa de eclosão, desde as temperaturas de 17°C a 23°C, mostrando uma pequena descida a 25°C (Figura 4.11). A temperatura onde se verificou uma menor percentagem de ovos eclodidos foi a de 17°C, visto que passado 48 horas houve 27% de taxa de eclosão, seguindo-se da temperatura de 19°C, no qual esta subira ligeiramente de 25% em 24 horas para 40% em 48 horas. Aos 21°C, após 24 horas a taxa de eclosão foi muito idêntica à temperatura de 23°C (21°C – 41%; 23°C – 42%). No entanto, nas 24 horas seguintes, a temperatura de 21°C não teve uma taxa de eclosão significativa, visto que esta apenas aumentou até aos 56% de ovos eclodidos. Por outro lado, a temperatura 23°C permitiu que todos os ovos conseguissem eclodir. A 25°C essas taxas de eclosão foram inferiores à temperatura de 21°C e 23°C, mas superiores a 17°C e 19°C (Anexo II).

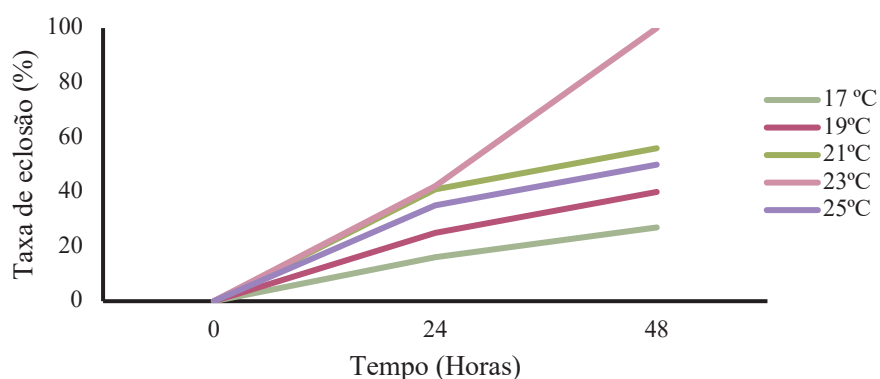


Figura 4.11 - Taxa de eclosão dos ovos de *Calceostoma glandulosum* a temperaturas distintas: 17°C, 19°C, 21°C, 23°C e 25°C durante 48 horas

4.5. Ensaio 3 – Especificidade de *Calceostoma glandulosum*

A contagem do número de ovos nos diversos tanques dos reprodutores com espécies distintas permitiu determinar se a espécie de monogéneo a ser estudada teria um hospedeiro específico. No tanque R1, onde se encontravam *S. aurata*, apareceram $0,03 \pm 0,01$ ovos/cm/dia de *C. glandulosum*; no R4 com indivíduos de *D. sargus* não se verificou o aparecimento de *C. glandulosum*; no tanque R5, composto por *S. rivoliana*, o aparecimento de ovos foi quase nulo. Por outro lado, nos tanques de *A. regius* houve um grande aparecimento de ovos, em que R3 com $0,33 \pm 0,1$ ovos/cm/dia, no R7 com $0,35 \pm 0,1$ ovos/cm/dia e por fim no R8, que obteve $0,98 \pm 0,3$ ovos/cm/dia.

Analisando estatisticamente, após a realização da ANOVA onde $p\text{-value} = 0,000 (< 0,05)$ não cumpriu com os requisitos, assumindo que existiriam diferenças significativas entre os tanques dos reprodutores. Desta forma, procedeu-se ao teste *Tukey* para perceber onde ocorreu as diferenças no número médio de ovos de *C. glandulosum*, pelo nível de significância 0,05, verificando esse pressuposto entre os tanques R1-R8, em R4-R8 e R5-R8.

Tabela 4-II - Contagem total de ovos de *Calceostoma glandulosum* presente nos tanques de reprodutores: R1 - *Sparus aurata*; R3 - *Argyrosomus regius*; R4 - *Diplodus sargus*; R5 - *Seriola rivoliana*; R7 - *Argyrosomus regius*; R8 - *Argyrosomus regius*; a, b, c representam os pares que apresentam diferenças estatisticamente significativas

	R1 ^a	R3	R4 ^b	R5 ^c	R7	R8 ^{a, b, c}
Nº Ovos/cm/dia	0,03 ± 0,014	0,33 ± 0,140	0	0,00 ± 0,003	0,35 ± 0,107	0,98 ± 0,246

Nos tanques de terra, correspondente à fase da engorda, existem várias espécies de peixes, tais como *D. sargus*, *S. aurata*, *A. regius*, *D. cervinus*, *D. labrax*, *E. marginatus* e *S. senegalensis*, nos quais eram realizadas análises, regularmente, para a observação de parasitas externos. No entanto, *C. glandulosum* foi encontrada apenas em *A. regius* com uma intensidade média de $3,83 \pm 2,1$ parasitas/hospedeiro, utilizando seis indivíduos. No geral, todos as corvinas amostradas apresentavam no mínimo um parasita por peixe, sendo que o máximo verificado foi 7 (Tabela 4-I), distribuídos pelos dois primeiros arcos branquiais do lado esquerdo do peixe. Nas restantes espécies presentes nos tanques, *C. glandulosum* nunca foi encontrada.

4.6. Ensaio 4 – Teste de diferentes produtos na eliminação do parasita *Calceostoma glandulosum* das brânquias de *Argyrosomus regius* em laboratório

Vários tratamentos foram efetuados para tentar eliminar os monogéneos das brânquias de *A. regius*, nomeadamente formol com concentração de 200 ppm e 300 ppm, água doce e 2 – fenoxietanol a 150 ppm.

De um modo geral, todos os tratamentos tiveram um padrão comum, visto que ao longo dos dias o número de ovos dos parasitas reduziu significativamente. À exceção da água doce, a ocorrência dos ovos diminuiu até ao terceiro dia, mas voltou a aumentar constantemente a partir do quarto dia (Figura 4.12).

No segundo dia do banho de tratamento realizado ao peixe, o que teve maior efeito na eliminação do parasita foi o formol a 200 ppm, seguindo-se do tratamento com 2-fenoxietanol, depois formol a 300 ppm e por fim a água doce. Mas o mesmo não ocorreu nos dias seguintes, apenas o formol a 200 ppm teve uma redução contínua até ao quinto dia de tratamento, tendo

um ligeiro aumento ao sexto dia. Neste tratamento um dos peixes acabou por morrer ao 4º dia e os restantes ao 7º dia, impedindo a conclusão do mesmo. Uma das observações feitas a *A. regius* que tinham morrido foi a presença de lesões na pele entre a barbatana anal e caudal, apresentando uma grande vermelhidão e alguma descamação (Figura 4.12). No banho a 300 ppm de formol o número de ovos reduziu significativamente, tendo sido eliminados completamente ao fim de sete dias. E por fim, o 2-fenoxietanol que obteve uma diminuição do primeiro para o segundo dia, tendo um aumento no aparecimento de ovos na água no período de três dias, voltando a diminuir nos restantes dias até à sua morte que ocorreu após o sexto dia.

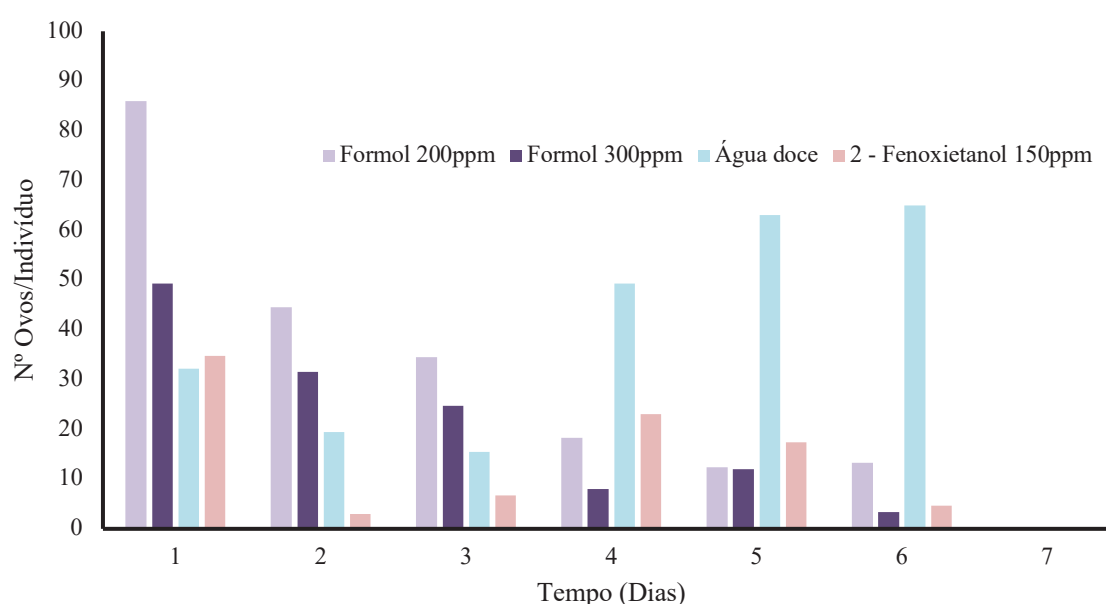


Figura 4.12 - Representação gráfica dos tratamentos efetuados em *Argyrosomus regius* para eliminar monogéneos presentes nas brânquias, nos quais foram utilizados: formol a 200 ppm e a 300 ppm, água doce e 2-fenoxietanol. Os dados foram representados em número de ovos por indivíduo ao longo dos dias.



Figura 4.13 - *Argyrosomus regius* com ocorrência de lesões durante o tratamento de formol a 200ppm. Original do autor

5. Discussão

Neste estudo, é feito pela primeira vez a caracterização morfológica de *C. glandulosum*, através da observação dos ovos, *oncomiracidium* e o parasita adulto e como os fatores ambientais podem ter efeitos no seu ciclo de vida.

A importância de conhecer as dimensões dos ovos deve-se a encontrar novas medidas a implementar como forma de evitar que os ovos de monogéneos entrem para os tanques das aquaculturas. Os ovos apresentam uma variedade de tamanhos, filamentos de fixação e formas, que podem ser esféricas (e.g. *Dactylogyrus vastator* (Chaudhary *et al*, 2017)), ovóides (e.g. *Paracaesicola nanshaensis* n. gen. (Zhou *et al*, 2020)), fusiformes (e.g. *Heterobothrium okamotoi* (Hirazawa *et al*, 2003)), tetraédricos (e.g. *Neobenedenia sp.* (González, 2015)) ou em forma de urna (e.g. *Neoentobdella natans*) (Kear & Whittington, 2005), conforme a espécie (Kear, 1986). Os ovos de *C. glandulosum*, neste estudo, exibiram um formato tetraédrico, cujo tamanho médio foi $79 \pm 7 \mu\text{m}$ e com filamentos em cada vértice com comprimento de $54 \pm 6 \mu\text{m}$, totalizando $133 \pm 13 \mu\text{m}$. Os apêndices que compõem os ovos, caracterizavam-se por apresentarem nas suas extremidades as pontas arredondadas à exceção de um que terminava em forma de “Y”. Porém Euzet & Ktari (1973) e Kear (1986) descrevem as mesmas características para uma espécie da mesma família de Calceostomatidae, *Calceostomella inermis*, geralmente encontrada em *Sciaena umbra* e *Umbrina cirrosa* (Strona *et al*, 2010), mas Castelló (2015) observou pela primeira vez em *Mullus surmuletus*. Já Hayward *et al* (2007) faz referência a um ovo tetraédrico de *C. glandulosum*, presente em *Argyrosomus japonicus*, mas com os filamentos dispostos numa posição diferente, sem descrever quaisquer outras características do mesmo.

O desenvolvimento do embrião de monogéneos, processo semelhante entre espécies, é realizado por quatro estágios, como descrito por Militz *et al* (2014) e Maciel *et al* (2017). O parasita, quando atinge a maturação sexual, expele o ovo para fora do seu corpo, cujo embrião se encontra sob a forma de uma massa escura – Fase II, essa massa vai-se desenvolver juntamente com o ovo, multiplicando numerosas células (blastómeros) à sua volta, dando origem à *oncomiracidium*, exibindo uma silhueta evidente e dois pares de pontos oculares bem visíveis – Fase III. Na fase final, a larva posiciona-se ao longo do ovo com a região cefálica na direção do opérculo e através de diversos movimentos consegue abri-lo permitindo a sua saída, dando origem a um ovo eclodido – Fase IV. Contudo, quando as condições não são favoráveis para a reprodução dos monogéneos o embrião não tem a capacidade de se desenvolver, o que torna o ovo inviável – Fase I.

Relativamente à fase de vida, *oncomiracidium*, foi feita uma descrição da fecundidade e da sua sobrevivência. Após o desenvolvimento completo do embrião dentro do ovo, a *oncomiracidium* ciliada é libertada, iniciando a sua natação livre em busca de um hospedeiro, antes que as suas reservas energéticas esgotem ou o tempo de vida termina (Whittington & Kearn, 2011). A maioria das larvas de monogéneos não tem uma longevidade superior a 48 horas, no entanto 10% de todas as espécies estudadas vivem mais do que 24 horas, tendo um período médio de sobrevivência de 12,5 horas após a eclosão a 20°C (Repullés-Albelda *et al*, 2013). Para *C. glandulosum* esse tempo de vida foi determinado aproximadamente 26 horas de sobrevivência após a eclosão.

Os parasitas exibem uma elevada fecundidade, de modo a aumentar a probabilidade dos descendentes localizarem e infetarem os seus novos hospedeiros com sucesso, daí haver a necessidade da produção de um grande número de ovos (Hoai, 2020). A maturação sexual foi definida ao primeiro sinal de ovos filtrados nos tanques de infeção, pois esta acontece quando os organismos estão aptos a produzir ovos e gerar nova descendência, neste caso entre o 11º e o 14º dia, conseguindo ser fecundo durante 10 dias. Contudo, nos primeiros dias de infeção ainda ocorriam ovos nos tanques, isto aconteceu devido a já existir uma infeção prévia por parte de *C. glandulosum* nos tanques de terra onde os indivíduos de *A. regius* se encontravam, pois, o tratamento inicial antes do ensaio de infeção não foi eficaz na eliminação do parasita, sendo estes dados descartados. Com o passar dos dias estes foram reduzindo o seu número até não haver a produção durante um determinado tempo, o que permitiu conhecer o momento em que *C. glandulosum* atingira a maturação sexual. Foram utilizados seis peixes, mas apenas três destes conseguiram completar a fecundidade totalmente, enquanto três desses peixes morreram durante o ensaio o que não foi possível observar o término do período de fecundidade.

A fecundidade e a maturação sexual não são influenciadas apenas pela temperatura (Tubbs *et al*, 2005), mas também pelas diferentes espécies de monogéneos, nomeadamente *Dactylogyrus vastor* que consegue atingir a sua maturação ao 9º - 10º dia, *Dactylogyrus anchoratus* ao fim de 6 dias, *Benedenia seriolae* entre os dias 16 e 20 após a infeção, *Zeuxapta seriolae* ao 25º dia, *Heterobothrium ecuadori* após 38 dias, *Pseudorhabdosynochus lantauensis* ao 7º dia, *Cichlidogyrus spp.* ao fim de 4 a 6 dias e *Neobenedenia sp.* após 24 horas (Aguirre-Fey *et al*, 2015; Erazo-Pagador & Cruz-Lacierda, 2010; Gonzáles, 2015; Zhang *et al*, 2015).

C. glandulosum, embora tenha sido encontrado apenas nas brânquias dos peixes, pode ser localizado na cavidade bucal e nas barbatanas. As suas dimensões contêm algumas variações, cujo tamanho é de $2,10 \pm 0,8$ mm, devido ao seu corpo ser muito flexível, alongando-se e

encolhendo-se com bastante facilidade, auxiliando a sua locomoção e alimentação, devido à lapela existente na região cefálica. Williams (1989) demonstra, igualmente que *C. glandulosum* possui dois congêneres, que diferem em termos de dimensões. O parasita *C. calceostoma* apresentava um comprimento médio de 3,295 μm (2,875 – 4,002) em Tunes e 6,302 μm no Golfo da Biscaia e *Calceostoma herculana* possuía um comprimento médio total de 2,500 – 3,500 μm , enquanto que *C. glandulosum* tinha um tamanho de 2,724 μm (1,848 – 4,176). A distinção de *C. glandulosum*, neste trabalho, foi feita através da comparação das dimensões, dado que possuía um tamanho muito inferior a *C. calceostoma*, e por apresentar valores menores do limite inferior do comprimento de *C. herculana*. Para além dessa distinção, a estrutura do sistema reprodutor pode identificar as espécies em questão, porém, neste caso não foi possível diferenciar quaisquer órgãos internos ao microscópio ótico ou à lupa. Essa distinção poderia ser feita em microscopia eletrónica de transmissão, que permitisse visualizar as estruturas internas com mais detalhe.

Pela utilização de técnicas moleculares pretendeu-se confirmar a espécie filogeneticamente. Na extração do DNA o rácio da absorvância de 260/230 e 260/280 determinam a pureza do DNA, indicando a presença de contaminantes durante o processo da extração deste (García-Alegria *et al*, 2020). Relativamente a este trabalho, os valores do rácio 260/230 encontram-se dentro dos valores ideais (2,1-2,3), porém o rácio 260/280, que deveria estar próximo de 1,8 (Koetsier & Cantor, 2019), apresentou um resultado um pouco elevado. Apesar da contaminação por proteínas ou fenóis estar evidente na medição, este resultado não teve qualquer influência no DNA, pois este conseguiu detetar uma banda a 129 bp, demonstrando que os *primers* desenhados, através da sequência conhecida, funcionaram e o fragmento foi recortado e seguido para sequenciação para uma melhor confirmação. Devido ao fator tempo, os resultados da sequenciação não foram descritos neste trabalho, mas serão inseridos numa futura publicação.

Os filamentos nas extremidades dos ovos têm a principal função de adesão às brânquias dos peixes, providenciando uma estratégia de segurança contra predadores, danos mecânicos e anoxia, melhorando a hipótese de ocorrer reinfeções nos hospedeiros (Maciel *et al*, 2018). Para a recolha desses ovos foram testados quatro substratos diferentes, algodão, corda, plástico poliestireno e plástico polipropileno, com o objetivo de entender qual o mais eficiente na adesão dos ovos, para se proceder à eclosão *in vitro* de um número significativo de larvas necessárias a um ensaio posterior. O substrato que obteve os melhores resultados, estatisticamente, foi a corda, não se verificando diferenças significativas entre os tanques de *A. regius*. Este material

era produzido com nylon, que foi moldado posteriormente numa corda permitindo que se formassem pequenas cavidades, onde os ovos ficavam alojados, dado que os pequenos filamentos de nylon se mantinham na estrutura inicial impedindo que os apêndices dos ovos não tivessem tanta facilidade em se fixar. Noutros estudos, também, foram utilizados outros materiais compostos com nylon como redes, onde os ovos se depositam e aderem, ou em formato de fios (Hirazawa *et al*, 2010). Apesar do algodão ter apresentado uma maior dispersão nos dados, foi o substrato que reteve uma maior quantidade de ovos quando comparado com outros materiais. Estas diferenças poderão ter ocorrido, possivelmente, devido às grandes concentrações de matéria orgânica que aderiam, originando erros de contagem por parte do operador, tendo os ovos a capacidade de se camuflar, o que torna a sua visualização mais difícil. A camuflagem ocorre como uma estratégia contra predadores, sendo que o mesmo acontece nos organismos adultos onde se verifica uma coloração semelhante ao ambiente que os rodeia (Kearn, 2004). Para além disso o algodão, também utilizado por Grano-Maldonado *et al* (2015) e Fajer-Ávila *et al* (2007), quando colocado na água vai dissipando os seus filamentos separando-os, o que fornece uma maior área de adesão.

Nos dois tipos de plástico a recolha de ovos foi muito baixa, quase nula, isto porque as diferenças eram bastante evidentes, quando comparados com os outros substratos utilizados na testagem da recolha de ovos, o que comprovou que estes não seriam os materiais mais adequados para a sua fixação. Não houve adesão em ambos os materiais por estes serem demasiado rígidos e lisos, sendo que o poliestireno é produzido com um alto brilho superficial, o que auxilia a que este produto não tenha nenhum tipo de rugosidade, daí os filamentos dos ovos não conseguirem aderir. Por outro lado, o polipropileno teve pouca adesão por parte destes, dado que é um material extremamente versátil, podendo ser flexível, dependendo para que fim é produzido (Kim & Kim, 2004) e também por ter sido preparado pelo operador o que pode ter originado pequenas saliências nas extremidades ao ser cortado com uma tesoura.

Estatisticamente analisando, foi possível comprovar que não existiam diferenças significativas em poliestireno ($p\text{-value} = 1,0$), sendo uma variável constante, uma vez que os valores foram iguais a zero em todas as amostragens. Como referido anteriormente a corda foi o único material que cumpriu com os requisitos pressupostos, não havendo diferenças estatisticamente significativa ($p\text{-value} > 0,05$). Pelo contrário, tanto o polipropileno como o algodão apresentaram diferenças entre tanques. Adicionalmente, quando analisados os três tanques verificaram-se que existiam grande variabilidade, pois de um modo geral, mesmo com a temperatura semelhante, o tanque R8 obteve uma maior quantidade de ovos quando

comparado com R3 e com R7, sendo que este último teve resultados muito inferiores relativamente a R8. Isto pode ter acontecido pela existência de mais uma corvina do que nos restantes tanques de reprodutores aumentando o contacto entre indivíduos permitindo a transmissão do parasita (Johnson *et al*, 2011) ou pela existência de um maior número de monogéneos alojados nas brânquias, o que permite uma maior quantidade de ovos que vão ser libertados na coluna de água.

Com a realização do teste *Tukey* compreendeu-se onde as diferenças estatisticamente significativas estariam a ocorrer, provando que no tanque R8 existiu uma maior dispersão de dados entre os substratos, nomeadamente em Poliestireno - Algodão, Polipropileno – Corda, Polipropileno – Algodão e Corda – Algodão. Isto pode ser explicado pelo volume do tanque R8 ser maior, 10,6 m³, enquanto que os restantes contêm apenas 8,2 m³, o que leva a que os ovos se dissipem por várias zonas, dado que as armadilhas se encontravam no mesmo local durante os cinco dias de permanência na água. No tanque R3 as maiores diferenças ocorreram em poliestireno – corda e poliestireno – algodão, demonstrando que o poliestireno não foi o melhor substrato para a fixação dos ovos, comprovado anteriormente que este apresentava algumas saliências ou rugosidade onde os ovos conseguiam ficar presos, mas que não seria o suficiente. Por outro lado, o tanque R7 demonstrou as menores quantidades de ovos fixados em todos os materiais, havendo valores muito semelhantes, o que fez com que não houvesse grande variação nos dados.

Contrariamente aos resultados provenientes dos tanques dos reprodutores, os substratos colocados nos tanques de terra não obtiveram qualquer adesão por parte dos ovos. Tal deve ter ocorrido por a estrutura não ter ficado bem posicionada, pela vasta área dos tanques ou pela profundidade da saída de água, o que permite que os ovos estivessem mais dispersos na coluna de água e/ou depositados no substrato.

Outros métodos utilizados para a recolha de ovos poderiam ter sido testados, tais como a utilização de plantas aquáticas ou objetos que permitissem que estes se emaranhassem, na remoção dos organismos nas brânquias dos peixes, sendo essencial o sacrifício dos peixes para a sua observação (Hutson *et al*, 2018) ou através da filtração da água com uma malha (Maciel & Alves, 2018). Contudo, este último não seria eficiente para tanques com 8,2 e 10,6 m³ cujo caudal da saída de água era forte, ou pelo método de filtração descrito por Marchiori *et al* (2013).

Um dos principais fatores ambientais que influencia a produção de ovos, a eclosão das larvas e o ciclo de vida da *oncomiracidium* é a temperatura (Turgut, 2012), uma vez que os monogéneos possuem um valor ótimo específico e caso este se mantenha durante um período longo, a janela de infecção torna-se maior, levando à produção de mais gerações de parasitas (Löhmus & Björklund, 2015). No geral, a transmissão e a maior incidência destes indivíduos são sazonais, apresentando flutuações ao longo do ano (Sitjà-Bobadilla *et al*, 2010), mas é essencial conhecer o seu comportamento em diferentes temperaturas permitindo compreender como os monogéneos podem ser afetados por este parâmetro e qual a melhor forma de atuar perante um surto de doença causado por estes indivíduos (Hirazawa *et al*, 2010). Ao longo deste estudo verificou-se que *C. glandulosum* também era afetada pelas flutuações da temperatura da água, pois visualizou-se uma descida significativa na produção de ovos na transição do outono para o inverno, onde neste foram atingidos valores mínimos, voltando a aumentar significativamente no início da primavera e descendo, de novo, com temperaturas muito elevadas no verão.

Deste modo, foram colocadas armadilhas durante cinco dias em diferentes épocas do ano, onde as temperaturas da água atingiram os 13°C, 14°C, 16°C, 17°C, 22°C e 24°C, realizando a contagem do número de ovos produzidos, através do aparecimento destes no substrato de recolha nos tanques dos reprodutores. Após os cinco dias verificou-se que a ocorrência de *C. glandulosum* teve um aumento considerável com a subida da temperatura da água entre os meses de novembro a março, onde as temperaturas atingiram um mínimo de 13°C, no qual a produção de ovos foi praticamente nula, aumentando até aos 20°C e a partir daí diminuindo a sua produção. O aumento da temperatura também influenciou uma maior produção de *Diplozoon kashmirensis* (Shah *et al*, 2013), *Neobedenia girellae* (Hirazawa *et al*, 2010), *Caballerocotyla sp.* (E Mahmoud *et al*, 2020), e *Discocotyle sagittata* (Rubio-Godoy & Tinsley, 2008). Shvydka *et al* (2020) prova que a diminuição dos 17°C para os 22°C pode ter sido influenciada pela resistência a algumas doenças que os peixes tendem a formar com o aumento da temperatura, visto que as suas defesas imunitárias são ativadas, uma vez que os organismos ectotérmicos com temperaturas mais baixas a imunidade celular e humoral específica e não específica podem ser afetadas (Jackson & Tinsley, 2002), nomeadamente em *A. regius* que apesar de se conseguir adaptar a uma vasta gama de temperaturas, prefere temperaturas superiores a 23°C (Kounna *et al*, 2021). Para além das alterações imunológicas de *A. regius* quando se encontra em condições ótimas, estas flutuações na prevalência de monogéneos pode ser afetada pela alimentação do hospedeiro ou por mudanças a nível

hormonal que tornam os hospedeiros mais ou menos suscetíveis a estes organismos (Kim *et al*, 2001).

Contrariamente a estes resultados observou-se que existiam outros monogéneos que necessitavam de temperaturas baixas para sobreviver, nomeadamente *Diplectanum sp.*, também encontrado em *A. regius*, que possuiu um comportamento inversamente proporcional a *C. glandulosum*, visto que a produção de ovos diminuía com o aumento da temperatura nos meses durante a primavera-verão. Este comportamento de *Diplectanum sp.* pode ser confirmado por vários estudos que indicam que esta espécie origina uma maior quantidade de ovos no inverno, quando as temperaturas da água estão mais baixas diminuindo até ao verão e onde atingem produções mínimas, voltando a subir novamente no final do outono (Eissa *et al*, 2016). O mesmo acontece em *Sparicotyle chrysophrii* que é apta a temperaturas baixas, o que promove uma elevada prevalência destes indivíduos em *S. aurata*, coincidindo com a imunodeficiência dos peixes às diferenças brutais da temperatura durante a transição do verão para o inverno (Antonelli *et al*, 2010).

O desenvolvimento dos ovos de monogéneos, processo semelhante entre espécies, é realizado por quatro fases, como descrito em *Dawestrema cycloancistrum* por Maciel *et al* (2018). Na primeira fase, o parasita expelle o ovo para fora do seu corpo, cujo embrião se encontra sob a forma de uma massa escura, essa massa vai-se desenvolver juntamente com o ovo, multiplicando numerosas células (blastómeros) à sua volta, dando origem à *oncomiracidium*, exibindo uma silhueta evidente e dois pares de pontos oculares bem visíveis. Na fase final, a larva posiciona-se ao longo do ovo com a região cefálica na direção do opérculo, sendo possível observar-se movimento da mesma. No entanto, a temperatura pode prejudicar esse desenvolvimento, tornando os ovos inviáveis. Com a diminuição deste parâmetro nas épocas do ano mais frias (13°C – 14°C) a viabilidade dos ovos tendeu a diminuir, notando a produção de um maior número de ovos translúcidos ou danificados, o que indicou que o embrião não se desenvolveu. Em consequência deste aumento da inviabilidade, o aparecimento de ovos eclodidos diminuiu de igual forma, bem como aqueles que apresentavam os ovos embrionados ou em desenvolvimento. Zhang *et al* (2021) afirma que os ovos quando expostos a temperaturas muito baixas a eclosão falha completamente, trazendo problemas para o desenvolvimento do embrião. Porém quando estes são depositados em temperaturas baixas, mas ainda dentro dos limites toleráveis de *C. glandulosum*, os ovos podem ser conservados e retomar o seu desenvolvimento aquando os fatores ambientais estiverem favoráveis, pois os ovos são abastecidos com reservas energéticas e lípidos importantes que facilitam a

longevidade larvar, o sucesso do desenvolvimento e podem ainda produzir ovos de maior tamanho (Brazenor *et al*, 2020). O mesmo acontece em *D. sagittata*, quando as temperaturas se encontram inferiores a 10°C os níveis de viabilidade são muito baixos (Rubio-Godoy & Tinsley, 2008), bem como *Protopolystoma orientalis* (Jackson *et al*, 2001) e em *Protopolystoma xenopodis* (Tinsley *et al*, 2011).

Todavia, o limite máximo verificado não foi coerente com os valores ótimos para a eclosão das *oncomiracidia* de *C. glandulosum*, explicado anteriormente que pode ter sido influenciado pelo sistema fisiológico de *A. regius* e por o ensaio ter sido realizado em condições totalmente controladas. Utilizando a mesma quantidade de stock de ovos para eclodir *in vitro*, assumiu-se que o valor ótimo da eclosão ocorreu quando o maior número de ovos de monogéneos terá eclodido até às primeiras 48 horas após a sua recolha nos tanques de reprodutores. No fim desse período de incubação até à eclosão, aos 23°C os ovos eclodiram na sua totalidade provando que esta era a temperatura que mais sucesso tinha para uma rápida eclosão. Conforme a temperatura aumentava o número de ovos eclodidos também era maior, completando assim o ciclo de vida mais rapidamente, provocando um aumento no metabolismo e o desenvolvimento dos embriões o que permite que a infeção do hospedeiro seja contínua (Brazenor & Hutson, 2015). Muitas outras espécies de monogéneos expõem uma gama específica entre si, nomeadamente *B. seriolae* onde a eclosão dos ovos ocorreu a temperaturas que variam entre os 14°C e os 28°C (Ernst *et al*, 2005), em *Z. seriolae* o sucesso da eclosão já ocorre a temperaturas mais baixas, entre os 13°C e os 18°C (Tubbs *et al*, 2005) e *D. anchoratus* que suporta entre 13°C a 26°C (Mello *et al*, 2015), mas com relatos em outros estudos que a gama de tolerância pode ser mais alargada, de 10°C a 24°C (Barker & Cone, 2000).

No entanto, para a eclosão *in vitro* ser estimulada é preciso ter em conta não só o fator temperatura, mas proporcionar outras condições essenciais ao cultivo desta espécie, tais como realizar renovações de água diariamente, como forma de aumentar o oxigénio dissolvido, ter uma intensidade luminosa e fotoperíodo adequados, existência de muco, tecidos ou ureia do hospedeiro e garantir que não existe o surgimento de perturbações mecânicas (Hutson *et al*, 2018).

Os monogéneos são conhecidos pela sua elevada especificidade, isto é, a exclusividade ou restrição de ocorrência de uma determinada espécie de parasita em uma ou mais espécies de hospedeiros (Whittington *et al*, 2000), não só do órgão onde aderem, mas também do hospedeiro (Kaci-Chaouch *et al*, 2008). Após a recolha dos ovos em diversas espécies reprodutoras, nomeadamente em *D. sargus*, onde não foi observado qualquer ovo ali presente,

contrariamente a *S. aurata* e de *S. rivoliana*, pois foi encontrado uma quantidade vestigial de ovos de *C. glandulosum* que poderá ter entrado no sistema de água e consequentemente para os tanques. Como a quantidade foi demasiado baixa nesses indivíduos, pôde-se assumir que esta espécie não teve a capacidade de infetar outros reprodutores para além de *A. regius*, que através da análise estatística se provou que este hospedeiro era específico para *C. glandulosum*, visto que existiam grandes diferenças entre os tanques que teriam as outras espécies de reprodutores. Além disso, foram observadas outras espécies de monogéneos, através da visualização de ovos distintos, nos tanques onde *C. glandulosum* não foi encontrada, sendo que estes não se localizavam nos tanques de corvinas, podendo afirmar que eram específicos de outros hospedeiros, nomeadamente de *Microcotyle sp.* em *S. aurata* e uma espécie não identificada por falta de informação em *D. sargus*. Nas amostragens regulares dos tanques de terra, correspondendo à fase de engorda, não foi visualizado *C. glandulosum* em nenhum peixe, à exceção de *A. regius*, o que continua a comprovar que esta espécie é mesmo específica deste hospedeiro. Outros autores relataram que a especificidade pode ocorrer por géneros, como por exemplo *Lamellodiscus* em Sparidae, *Thaparocleidus* em Pangasiidae, *Cichlidogyrus* de Cichlidae, *Dactylogyrus* em Cyprinidae, e por fim *Gyrodactylus* em Gobiidae (Graça *et al*, 2018).

A *oncomiracidium* é capaz de distinguir o seu hospedeiro de outros animais (Ohhashi *et al*, 2007) uma vez que procuram recursos estáveis, geralmente de maior porte com uma vida longa, que estejam em grande abundância ou que sejam hospedeiros presentes no topo da cadeia alimentar (Mendlová & Šimková, 2014). A morfologia do seu órgão de fixação é um fator bastante importante para a especialização e adaptação aos seus hospedeiros, que através do contacto físico ou pelo desencadeamento de recetores químicos e moleculares permitem a sua adesão. O muco dos peixes funciona como uma barreira química a bactérias, fungos e parasitas, mas a evolução dos monogéneos permitiu que estes explorassem os seus hospedeiros. Porém quando os indivíduos se sentem ameaçados tentam inibir ou reduzir essa exploração através de mecanismos imunitários com o intuito de repelir os monogéneos e, ainda, a densidade das células epiteliais podem interferir na variação do local da adesão. Como resposta à infeção os hospedeiros tentam inibir ou reduzir essa exploração desencadeando mecanismos imunitários que tentam repelir os monogéneos, porém podem atrair outras espécies, nomeadamente em Gyrodactylideos existente em salmonídeos, isto porque o muco ou a epiderme podem produzir alguma substância que pode interferir com a sua fixação (Whittington *et al*, 2000).

As infecções por monogéneos ocorrem geralmente pela pobre qualidade da água, maioritariamente quando os níveis de amónia ou nitratos estão elevados, pela grande quantidade de matéria orgânica ou pelo oxigénio dissolvido na água se encontrar baixo, o que providencia a proliferação desses parasitas, dado que estes possuem um ciclo de vida simples e conseguem multiplicar-se muito rapidamente trazendo graves problemas aos peixes, acabando por levar à sua morte (E Mahmoud *et al*, 2020). Atualmente, um dos métodos mais utilizados na remoção destes parasitas é o tratamento por banho, utilizando alguns compostos químicos, nomeadamente formol, sulfato de cobre, permanganato de potássio, peróxido de hidrogénio ou triclorofon. Contudo estes tratamentos só proporcionam um controlo de população a curto prazo, dado que apenas são eficazes em determinadas fases do parasita (Doan *et al*, 2020).

Este ensaio sucedeu-se em consequência da não remoção de *C. glandulosum* por peróxido de hidrogénio, visto que a ocorrência dos seus ovos era recorrente após um banho de 150 ppm durante 30 minutos. No entanto, Hirazawa *et al* (2017) afirma que este composto quando se encontrava a uma concentração de 75 ppm conseguia eliminar monogéneos das espécies *N. girellae*, *B. seriolae*, e *Zeuxapta japonica* durante seis horas, sem que *S. dumerili* fosse afetada. Assim, pôde-se comprovar que tal não teve sucesso na erradicação dos monogéneos devido ao período de exposição ter sido muito inferior ao estudo comparado. Desta forma, devido a este insucesso várias medidas foram testadas para perceber qual o que teria a melhor eficácia.

O formol em ambas as concentrações foi o que conseguiu ter maior sucesso na redução da infeção parasitária, pois com o passar dos dias não houve qualquer subida no número de ovos encontrados, o que demonstrou grande eficácia, nomeadamente, com uma concentração de 300 ppm, eliminando completamente *C. glandulosum* das brânquias de *A. regius*. A concentração 200 ppm de formol também poderia ter tido grande eficácia, mas foi associada a uma grande mortalidade neste ensaio. Essa mortalidade pode ter sido originada pelo aparecimento de lesões na pele, no qual o químico estaria a prejudicar o seu estado de saúde ou por ter ocorrido uma proliferação de bactérias, trazendo outros problemas para o peixe. Para além deste químico ser o antiparasitário mais utilizado em banhos terapêuticos, que controla o aparecimento de parasitas externos nos peixes, incluindo os organismos destinados ao setor da alimentação, é um composto com propriedades carcinogénicas e a sua toxicidade afeta os organismos, quando administrado em grandes quantidades ou por um período de exposição longo (Hodkovicova *et al*, 2019). Vários estudos indicam que o melhor tratamento contra monogéneos é o formol a 150 – 200 ppm durante 3 a 6 horas (Pironet & Jones, 2000). Todavia, Cecchini & Varriale (2003) afirmam que este não é eficaz para todas as espécies de monogéneos e que a sua

concentração influencia de certa forma a redução ou eliminação dos mesmo, por exemplo a 300 ppm ocorreu uma diminuição significativa na eclosão de ovos e a morte de uma grande quantidade de *oncomiracidia*, mas o mesmo não acontece quando a concentração é inferior, uma vez que quando esta se encontrava a 100 ppm não afetou qualquer comportamento por parte dos ovos e das *oncomiracidia*. Por outro lado, Tokşen *et al* (2010) declara que o formol não tem efeito em *Diplectanum aequans*, um dos géneros encontrados nos peixes amostrados da EPPO.

Os anestésicos são frequentemente utilizados em aquacultura para diminuir o stress ou os danos mecânicos que os peixes sofrem durante o seu manuseamento. 2 – fenoxietanol é um desses anestésicos que tem diversas vantagens na sua utilização, incluindo a rápida indução da anestesia, a rápida recuperação após a transferência para água limpa, a fácil preparação e um preço reduzido (Máková *et al*, 2008). Para além da sua função normal, este tem a capacidade de remover parasitas das brânquias e apesar de permanecerem vivos, os monogéneos caem anestesiados destas (Vaughan & Chisholm, 2010), razão pela qual houve uma diminuição de *C. glandulosum* nos primeiros dias e voltando a subir nos restantes, dado que os indivíduos poderiam soltar-se das brânquias após o peixe ser retirado da água do tratamento e transferido para um tanque com água limpa, permitindo uma reinfeção durante as 24 horas seguintes. Em adição a concentração utilizada e o tempo de exposição ao químico podem ter sido baixos, pois Pironet & Jones (2000) fizeram um tratamento de 2-fenoxietanol a 300 ppm juntamente com água doce, durante 1h30min, no qual foi eficaz para a remoção de monogéneos das brânquias. Por outro lado, o aumento dos parasitas, ao longo dos dias, também pode ser explicado pelo facto do 2-fenoxietanol não ser o agente químico mais adequado para a remoção de monogéneos, pois após a realização de banho a *Salmo salar* o número de girodactilídeos não foi afetado, continuando a sua atividade de transmissão para novos hospedeiros (Grano, 2010).

Para além da temperatura, a salinidade é um parâmetro ambiental bastante relevante que afeta os monogéneos (Marchiori *et al*, 2015), uma vez que, quando esta diminui a produção de ovos tem um grande decréscimo, podendo tornar-se inativa para *N. girellae* quando atinge os 8 ppm (Umeda & Hirazawa, 2004). No banho de água doce realizado, a ocorrência de ovos diminui nos primeiros três dias, mas teve um aumento significativo ao 4º dia. Este tratamento, também, é muito comum para remover os parasitas fixos no hospedeiro, porém muitas das vezes a água doce somente mata os monogéneos, não conduzindo ao seu desprendimento, o que pode levar a erros de observação durante as contagens da intensidade de parasitas nas brânquias (Whittington & Kearns, 2011). Este atua apenas temporariamente contra a infeção, pois torna-

se ineficiente para matar os embriões que se encontram dentro do ovo e a reinfeção pode ocorrer imediatamente após o período de tratamento (Brazenor & Hutson, 2015). Existem evidências de que os ovos de monogéneos podem ser resistentes a alguns antiparasitários (Morales-Serna *et al*, 2018), devido à sua membrana possuir uma proteína esclaretizada que protege o embrião permitindo o seu desenvolvimento após ter sido submetido a tratamento, daí ser necessário uma imersão a longo prazo em água doce para erradicar os ovos, as *oncomiracidia* e os organismos adultos (Militz *et al*, 2014).

Outra das razões para o aumento dos ovos, durante os tratamentos realizados, pode resultar do stress no qual o peixe foi exposto, estimulando a produção de cortisol (Bremner *et al*, 2009). O cortisol é uma hormona glucocorticoide, secretada pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, induzido por fatores bióticos e abióticos, que desempenham um papel importante nos processos metabólicos, visto que, fornece energia crítica em resposta à infeção. Quando a resposta inflamatória ocorre em excesso as células do próprio hospedeiro podem ser danificadas (O'Dwyer *et al*, 2019), pois o cortisol atua de diferentes formas no sistema imunitário, incluindo modificações na distribuição, dinâmica e função dos leucócitos e reduzir o número de células T e B (Soberon *et al*, 2014), o que pode influenciar a estrutura onde a infeção ocorre (Harris *et al*, 2000). Com o sistema imunitário dos peixes em baixo, devido à produção excessiva de cortisol causado pelo elevado stress, estes não se conseguem defender de possíveis infeções, como o caso dos monogéneos. Desta forma, os parasitas, tendo as condições ótimas, conseguindo reproduzir-se rapidamente, uma vez que o seu ciclo de vida é extremamente rápido e assim aumentar a infeção nos seus hospedeiros, permitindo que ocorra a proliferação para outros.

6. Conclusão

C. glandulosum neste trabalho foi observado em três fases distintas, os ovos que apresentavam uma estrutura tetraédrica com três filamentos em cada vértice, contendo uma das extremidades em forma de Y; a *oncomiracidium*, cuja natação veloz proporcionada pelo movimento das várias *sensilla* ao redor do corpo providencia a transmissão de hospedeiro em hospedeiro mais facilmente; e por fim, a fase adulta, cujo parasita possui um comprimento característico $2,10 \pm 0,8$ mm, sendo possível a sua visualização quase a olho nu. É composto por um *haptor*, rodeado por uma ventosa que permite a sua fixação às brânquias.

Verificou-se que *C. glandulosum* é específico de *A. regius*, uma vez que este não foi encontrado tanto na fase adulta como em ovos noutras espécies de peixes, nomeadamente *S. aurata*, *D. labrax*, *D. sargus*, *D. cervinus*, *E. marginatus* e *S. senegalensis* e *S. rivoliana*.

Os filamentos dos ovos do parasita *C. glandulosum* são essenciais para a adesão ao hospedeiro, porém, quando testado, o substrato que teve adesão de mais ovos foi o algodão.

A temperatura é um fator importante para o ciclo de vida de *C. glandulosum*, a ocorrência de ovos inicia-se na primavera, diminuindo ligeiramente no verão, voltando a aumentar no outono, de acordo com a temperatura.

Relativamente à viabilidade dos ovos, esta aumenta com o aumento da temperatura da água. Com a contagem da ocorrência de ovos nos tanques dos reprodutores verificou-se que abaixo dos 14 °C os ovos têm 84% de inviabilidade, o que impede estes parasitas de se proliferarem rapidamente. Por outro lado, as taxas de eclosão tiveram 100% de sucesso quando a temperatura se encontrava a 23°C, porém os ovos estavam sujeitos a condições bastante controladas, nomeadamente temperatura e oxigénio dissolvido na água, o que permitiu esse sucesso.

De um modo geral, o ensaio para a procura de novas medidas eficazes na eliminação dos parasitas, demonstrou que o formol a 300 ppm erradicou completamente os parasitas das brânquias, mas mostrou-se um pouco severo, dado que os peixes morreram ao longo deste, tornando este método pouco eficaz. Já, o formol a 200 ppm, a sua eficácia teria que ser melhor estudada. Contrariamente o 2-fenoxietanol e a água doce não tiveram resultados favoráveis para a eliminação do parasita. No entanto, este ensaio poderia ser realizado com outros produtos químicos e utilizando um maior número de peixes para que os resultados fossem mais confiáveis.

Com este trabalho, foi possível conhecer melhor a espécie *C. glandulosum*, sendo possível a sua identificação através dos ovos, o que facilita nas análises de rotina de parasitas, não havendo a necessidade de sacrificar o animal para a observação de monogéneos. Em adição, o conhecimento de diversas formas de mitigação de *C. glandulosum*, permitem que sejam tomadas medidas, em diversas aquaculturas, tentando impedir a proliferação destes patógenos, de forma a que a saúde do peixe não fique comprometida.

7. Referências

Abdullah, Y. S. (2033). Study on the parasites of some fishes from Darbandikhan lake in Kurdistan region, Iraq [Dissertação de Mestrado não publicada]. Faculty of Science and Science Education School of Science at the University of Sulaimi.

Abraha, B., Admassu, H., Mahmud, A., Tsighe, N., Shui, X. W., & Fang, Y. (2018). Effect of processing methods on nutritional and physico-chemical composition of fish: a review. *MOJ Food Processing & Technology*, 6(4), 376-382.

Aguirre-Fey, D., Benítez-Villa, G. E., Pérez-Ponce de León, G., & Rubio-Godoy, M. (2015). Population dynamics of *Cichlidogyrus spp.* and *Scutogyrus sp.* (Monogenea) infecting farmed tilapia in Veracruz, México. *Aquaculture*, 443, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.004>.

Amer, O. S. A. (2014). The Impact of Fish Parasites on Human Health: Review Article. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 44(1), 249–274. <https://doi.org/10.12816/0006465>.

Amoedo, A. J. V. (2011). Determinação do requisito proteico em juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) [Dissertação de Mestrado não publicada]. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto.

Andree, K. B., Roque, A., Duncan, N., Gisbert, E., Estevez, A., Tsertou, M. I., & Katharios, P. (2015). *Diplectanum sciaenae* (Van Beneden & Hesse, 1863) (Monogenea) infecting meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) broodstock in Catalonia, Spain. A case report. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 1-2, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.02.006>.

Antonelli, L., Quilichini, Y., & Marchand, B. (2010). *Sparicotyle chrysophrii* (Van Beneden and Hesse 1863) (Monogenea: Polyopisthocotylea) parasite of cultured Gilthead sea bream *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) (Pisces: Teleostei) from Corsica: ecological and morphological study. *Parasitology Research*, 107(2), 389–398. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1876-0>.

Arechavala-Lopez, P., Valero-Rodriguez, J. M., Peñalver-García, J., Izquierdo-Gomez, D., & Sanchez-Jerez, P. (2015). Linking coastal aquaculture of meagre *Argyrosomus regius* and Western Mediterranean coastal fisheries through escapes incidents. *Fisheries Management and Ecology*, 22(4), 317–325. <https://doi.org/10.1111/fme.12129>.

Ariel, E., & Olesen, N. J. (2002). Finfish in aquaculture and their diseases-a retrospective view on the European community. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 22(2), 72-85.

Bagge, A. M., Poulin, R., & Valtonen, E. T. (2004). Fish population size, and not density, as the determining factor of parasite infection: a case study. *Parasitology*, 128(3), 305-313. <https://doi.org/10.1017/s0031182003004566>.

Balami, S., Sharma, A., & Karn, R. (2019). Significance of nutritional value of fish for human health. *Malaysian Journal of Halal Research*, 2(2), 32-34. <https://doi.org/10.2478/mjhr-2019-0012>.

Barber I, Hoare D, & Krause J. (2000). Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 131–165.

Barker, D. E., & Cone D. K. (2000). Occurrence of *Ergasilus celestis* (Copepoda) and *Pseudodactylogyrus anguillae* (Monogenea) among wild eels (*Anguilla rostrata*) in relation to stream flow, pH and temperature and recommendations for controlling their transmission among captive eels. *Aquaculture*; 187(3-4): 261-274. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00324-0](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00324-0).

Behrmann-Godel, J., Brinker, A., Coture, P., & Pyle, G. G. (2015). Biology and Ecology of Perch Parasites. *Biology of Perch*. CRC Press. 203-239. <https://doi.org/10.1201/b18806-11>.

Blahoua, G.K., Adou, E.Y., Etile, N.R., Yao, S.S., & N'Douba, V. (2018). Occurrence of gill monogenean parasites in redbelly tilapia, *Tilapia zillii* (Teleostei: Cichlidae) from lobo River, Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 35(3), 5674-5688.

Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., & Shariff, M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary parasitology*, 132(3-4), 249-272. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>.

Brazenor, A. K., Francis, D. S., Conlan, J. A., Carton, A. G., & Hutson, K. S. (2020). Temperature alters reproduction and maternal provisioning in a fish ectoparasite. *International Journal for Parasitology*, 50(10-11), 839-849. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.017>.

Brazenor, A. K., & Hutson, K. S. (2015). Effects of temperature and salinity on the life cycle of *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae) infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*). *Parasitology research*, 114(5), 1875-1886. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4375-5>.

Brazenor, A. K., Saunders, R. J., Miller, T. L., & Hutson, K. S. (2018). Morphological variation in the cosmopolitan fish parasite *Neobenedeniagirellae* (Capsalidae: Monogenea). *International Journal for Parasitology*, 48(2), 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.009>.

Bremner, J. D., Cheema, F. A., Ashraf, A., Afzal, N., Fani, N., Reed, L., Musselman, D. L., Ritchie, J. C., Faber, T., Votaw, J. R., Nemeroff, C. B., & Vaccarino, V. (2009). Effects of a cognitive stress challenge on myocardial perfusion and plasma cortisol in coronary heart disease patients with depression. *Stress and Health*, 25(3), 267–278. <https://doi.org/10.1002/smi.1246>.

Buchmann, K., & Lindenstrom, T. (2002). Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology*, 32(3), 309-319. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00332-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00332-0).

Buchmann, K., Lindenstrøm, T., & Bresciani, J. (2004). Interactive associations between fish hosts and monogeneans. *Host-parasite Interactions*, 55, 165-189. <https://doi.org/10.4324/9780203487709-8>.

Bui, S., Oppedal, F., Sievers, M., & Dempster, T. (2019). Behaviour in the toolbox to outsmart parasites and improve fish welfare in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 168-186. <https://doi.org/10.1111/raq.12232>.

Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4), 575-583. <https://doi.org/10.2307/3284227>.

Cardeira, J., Vallés, R., Dionísio, G., Estévez, A., Gisbert, E., Pousão-Ferreira, P., Cancela, M. L., & Gavaia, P. J. (2012). Osteology of the axial and appendicular skeletons of the meagre *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) and early skeletal development at two rearing facilities. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(3), 464–470. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01979>.

Castelló, E. F. (2015). Parasitofauna del salmonete de roca (*Mullus surmuletus*) en el Mediterráneo español: variabilidad espaciotemporal y su implicación pesquera (Dissertação de Doutoramento, Universitat de València).

Castro, R., & Tafalla, C. (2015). Overview of fish immunity. *Mucosal Health in Aquaculture*, 3–54. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417186-2.00002-9>.

Cecchini, S., & Cognetti-Varriale, A. M. (2003). Dehydration is more effective for the control of embryonic development and larval hatching of *Diplectanum aequans* (Monogenea, Diplectanidae) than formalin and trichlorophon. *Aquaculture International*, 11(3), 261–265. Disponível em 10.1023/A:1024892822958.

Chaudhary, A., Chiary, H. R., & Singh, H. S. (2017). First molecular confirmation of the *Dactylogyrus anchoratus* and *D. vastator* (Monogenea, Dactylogyridae) from *Carassius auratus* in western India. *BioInvasions Records*, 6(1), 79–85. <https://doi.org/10.3391/bir.2017.6.1.13>.

Cheng, T. (2012) General parasitology (2nd ed.) [S. l.]: New York: Academic Press

Crist, E., Mora, C., & Engelman, R. (2017). The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Science*, 356(6335), 260–264. <https://doi.org/10.1126/science.aal2011>.

Dawood, M. A. O. (2020) Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 642–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12492>.

de Sousa, S. B. (2017). Efeito combinado da temperatura e da proteína na performance de crescimento de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) [Dissertação de Mestrado não publicada]. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Dezfuli, B. S., Bosi, G., DePasquale, J. A., Manera, M., & Giari, L. (2016). Fish innate immunity against intestinal helminths. *Fish & Shellfish Immunology*, 50, 274–287. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.02.002>.

Dias, M. C. T. (2020). Ocorrência dos ovos de monogenea em diversos substratos de fixação em pisciculturas de tanques de terra: uma estratégia de prevenção [Dissertação de mestrado]. ReCiL – Repositório Científico Lusófona. <http://hdl.handle.net/10437/10208>.

Doan, H. V., Soltani, E., Ingelbrecht, J., & Soltani, M. (2020). Medicinal herbs and plants: Potential treatment of monogenean infections in fish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(2), 260–282. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1712325>.

Drago, F. B. (Ed.). (2017). Macroparásitos: Diversidad y Biología. Editorial de la Universidad de La Plata, 68–82. <https://doi.org/10.35537/10915/62010>.

Eissa, I., Derwa, H., El Lamie, M., Dessouki, A., Abo Esa, J., & El Raziky, E. (2016). Advanced Studies on Monogenean Diseases of *Argyrosomus regius*, *Dicentrarchus labrax* and

Epinephelus aeneus in Port Said Governorate. *Suez Canal Veterinary Medical Journal. SCVMJ*, 21(1), 159-162. <https://doi.org/10.21608/scvmj.2016.62783>.

Ekanem, A. P., Eyo, V. O., & Sampson, A. F. (2011). Parasites of landed fish from Great Kwa river, Calabar, cross river state, Nigeria. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 3(12), 225-230. <https://doi.org/10.9734/jsrr/2014/6918>.

E Mahmoud, A., A Osman, H., S Zaki, M., & Z Abubrika, A. (2020). Studies on the infestation of Red Sea cultured Black Sea bream (*Spondyliosoma cantharus*) with *Caballerocotyla* sp. (Monogenea; Capsalidae) parasite. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24(3), 417-424. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2020.92405>.

Erazo-Pagador, G., & Cruz-Lacierda, E. R. (2010). The morphology and life cycle of the Gill Monogenean (*Pseudorhabdosynochus lantauensis*) on Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) cultured in the Philippines. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 30(2), 55-64.

Ernst, I., Whittington, I. D., Corneillie, S., & Talbot, C. (2005). Effects of temperature, salinity, desiccation and chemical treatments on egg embryonation and hatching success of *Benedenia seriolae* (Monogenea: Capsalidae), a parasite of farmed *Seriola* spp. *Journal of Fish Diseases*, 28(3), 157-164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00605.x>.

Euzet, L., & Ktari, M. H. (1973). Les Calceostomatidae (Monogenea) parasites de Téléostéens du Golfe de Tunis: Développement larvaire et position systématique. *Bulletin de l'Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de Pêche Salammbo*, 2(4), 605-622.

Fajer-Ávila, E. J., Velásquez-Medina, S. P., & Betancourt-Lozano, M. (2007). Effectiveness of treatments against eggs, and adults of *Haliotrema* sp. and *Euryhaliotrema* sp. (Monogenea: Ancyrocephalinae) infecting red snapper, *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 264(1-4), 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.035>.

FAO (2005-2021). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Argyrosomus regius*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Texto por Stipa, P.; Angelini, M. Em: FAO Fisheries Division [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en]. Rome. Atualizado a 10 Fevereiro 2005. [Citado a 7 Janeiro 2021].

Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*, 500, 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>.

Fountoulaki, E., Grigorakis, K., Kounna, C., Rigos, G., Papandroulakis, N., Diakogeorgakis, J., & Kokou, F. (2017). Growth performance and product quality of meagre (*Argyrosomus regius*) fed diets of different protein/lipid levels at industrial scale. *Italian Journal of Animal Science*, 16(4), 685-694. <https://doi.org/10.1080/1828051x.2017.1305259>.

Gabriel, U. U., & Akinrotimi, O. A. (2011). Management of stress in fish for sustainable aquaculture development. *Researcher*, 3(4), 28-38.

García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., Rascón-Durán, M. L., & Astiazaran-García, H. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>.

Gephart, J. A., Golden, C. D., Asche, F., Belton, B., Brugere, C., Froehlich, H. E., Fry, J. P., Halpern, B. S., Hicks, C. C., Jones, R. C., Klinger, D. H., Little, D. C., McCauley, D. J.,

Thilsted, S. H., Troell, M., & Allison, E. H. (2020). Scenarios for global aquaculture and its role in human nutrition. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1-17. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1782342>.

Gil, M. D. M., Palmer, M., Grau, A., Deudero, S., Alconchel, J. I., & Catalán, I. A. (2013). Adapting to the wild: the case of aquaculture-produced and released meagres *Argyrosomus regius*. *Journal of Fish Biology*, 84(1), 10-30. <https://doi.org/10.1111/jfb.12241>.

Gil Oviedo, M. d. M. (2013). Recovery of meagre (*Argyrosomus regius*) population in the Balearic coastal ecosystem (Western Mediterranean) [Dissertação de Doutorado não publicada]. University of the Balearic Islands.

González, A. T. (2015). Behaviour, histopathology and immunobiology: interactions between the ectoparasite *Neobenedenia* (Monogenea: Capsalidae) and its host, *Lates calcarifer* (Perciformes: Latidae) (Dissertação de Doutorado, James Cook University).

Graça, R. J., Fabrin, T. M., Gasques, L. S., Prioli, S. M., Balbuena, J. A., Prioli, A. J., & Takemoto, R. M. (2018). Topological congruence between phylogenies of *Anacanthorus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae) and their Characiformes (Actinopterygii) hosts: A case of host-parasite cospeciation. *Plos one*, 13(3), e0193408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193408>.

Grano-Maldonado, M. I. (2010). The biological and behavioural basis of host selection in the transmission of *Gyrodactylus* (Monogenea) (Dissertação de Doutorado, University of Stirling). <http://hdl.handle.net/1893/3700>.

Grano-Maldonado, M. I., Aguirre-Villaseñor, H., Betancourt-Lozano, M., & Fajer-Ávila, E. J. (2015). In vitro effect of low salinity on egg hatching and larval survival of *Heterobothrium ecuadori* (Monogenea) infecting bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture Research*, 46(6), 1522-1526. <https://doi.org/10.1111/are.12300>.

Hansen, H., Bakke, T. A., & Bachmann, L. (2007). DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from *Gyrodactylus*. *Trends in Parasitology*, 23(8), 363-367. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.06.007>.

Harris, P. D., Soleng, A., & Bakke, T. A. (2000). Increased susceptibility of salmonids to the monogenean *Gyrodactylus salaris* following administration of hydrocortisone acetate. *Parasitology*, 120(1), 57-64. <https://doi.org/10.1017/s0031182099005223>.

Hayward, C. J., Bott, N. J., Itoh, N., Iwashita, M., Okihiro, M., & Nowak, B. F. (2007). Three species of parasites emerging on the gills of mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Temminck and Schlegel, 1843), cultured in Australia. *Aquaculture*, 265(1-4), 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.004>.

Hirazawa, N., Goto, T., & Shirasu, K. (2003). Killing effect of various treatments on the monogenean *Heterobothrium okamotoi* eggs and oncomiracidia and the ciliate *Cryptocaryon irritans* cysts and theronts. *Aquaculture*, 223(1-4), 1-13. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00167-4](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00167-4).

Hirazawa, N., Hagiwara, H., Tsubone, S., & Takano, R. (2017). Investigation of the toxicological and histopathological effects of hydrogen peroxide bath treatments at different concentrations on *Seriola* species and the effectiveness of these treatments on *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infestations. *Aquaculture*, 479, 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.019>.

- Hirazawa, N., Takano, R., Hagiwara, H., Noguchi, M., & Narita, M. (2010). The influence of different water temperatures on *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection, parasite growth, egg production and emerging second generation on amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae) and the histopathological effect of this parasite on fish skin. *Aquaculture*, 299(1-4), 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.025>.
- Hoai, T. D. (2020). Reproductive strategies of parasitic flatworms (Platyhelminthes, Monogenea): the impact on parasite management in aquaculture. *Aquaculture International*, 28(1), 421-447. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00471-6>.
- Hoai, T. D., & Hutson, K. S. (2014). Reproductive strategies of the insidious fish ectoparasite, *Neobenedenia* sp. (Capsalidae: Monogenea). *PLoS One*, 9(9), 108-801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108801>.
- Hodkovicova, N., Chmelova, L., Sehonova, P., Blahova, J., Doubkova, V., Plhalova, L., Fiorino, E., Vojtek, L., Vicenova, M., Siroka, Z., Enevova, V., Dobsikova, R., Faldyna, M., Svobodova, Z., & Faggio, C. (2019). The effects of a therapeutic formalin bath on selected immunological and oxidative stress parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment*, 653, 1120-1127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.035>.
- Hutson, K. S., Brazenor, A. K., Vaughan, D. B., & Trujillo-González, A. (2018). Monogenean Parasite Cultures: Current Techniques and Recent Advances. *Advances in Parasitology*, 99, 61-91. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2018.01.002>.
- Igeh, P. C., & Avenant-Oldewage, A. (2020). Pathological effects of *Cichlidogyrus philander* Douëllou, 1993 (Monogenea, Ancyrocephalidae) on the gills of *Pseudocrenilabrus philander* (Weber, 1897) (Cichlidae). *Journal of Fish Diseases*, 43(2), 177-184. <https://doi.org/10.1111/jfd.13121>.
- Ingelbrecht, J., Miller, T. L., Lymbery, A. J., Maita, M., Torikai, S., & Partridge, G. (2020). Anthelmintic herbal extracts as potential prophylactics or treatments for monogenean infections in cultured yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 520, 734776. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734776>.
- Jackson, J. A., Tinsley, R. C., & Du Preez, L. H. (2001). Differentiation of two locally sympatric *Protopolystoma* (Monogenea: Polystomatidae) species by temperature-dependent larval development and survival. *International Journal for Parasitology*, 31(8), 815-821. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00185-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00185-0).
- Jackson, J., & Tinsley, R. (2002). Effects of environmental temperature on the susceptibility of *Xenopus laevis* and *X. wittei* (Anura) to *Protopolystoma xenopodis* (Monogenea). *Parasitology research*, 88(7), 632-638. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0629-0>.
- Jerônimo, G. T., Tancredo, K. R., Costa, C. M. S., Ferreira, L. C., & Pádua, S. P. (2016). Monogenea: parasitos versáteis e problemáticos. *Aquaculture Brasil*, 1, 28 – 31.
- Jithendran, K. P. (2014) Parasites and Parasitic Diseases in Fish Culture System. *Veterinary Parasitology. Chennai: Central Institute of Brackishwater Aquaculture*. 321-376
- Johnson, M. B., Lafferty, K. D., Van Oosterhout, C., & Cable, J. (2011). Parasite transmission in social interacting hosts: monogenean epidemics in guppies. *PLoS One*, 6(8), Artigo e22634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022634>.

- Kaci-Chaouch, T., Verneau, O., & Desdevises, Y. (2008). Host specificity is linked to intraspecific variability in the genus *Lamellodiscus* (Monogenea). *Parasitology*, 135(5), 607. <https://doi.org/10.1017/s003118200800437x>.
- Karvonen, A., Kristjánsson, B. K., Skúlason, S., Lanki, M., Rellstab, C., & Jokela, J. (2013). Water temperature, not fish morph, determines parasite infections of sympatric Icelandic three spine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecology and evolution*, 3(6), 1507-1517. <https://doi.org/10.1002/ece3.568>.
- Kearn, G. C. (1986). The eggs of monogeneans. *Advances in Parasitology*, Volume 25, 175-273. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60344-9](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60344-9).
- Kearn, G. C. (2004). Other monogenean skin parasites. *Leeches, Lice and Lampreys: A Natural History of Skin and Gill Parasites of Fishes*, 61-81.
- Kearn, G. C., & Whittington, I. D. (2005). *Neoentobdella* gen. nov. for species of *Entobdella* Blainville in Lamarck, 1818 (Monogenea, Capsalidae, Entobdellinae) from stingray hosts, with descriptions of two new species. *Acta Parasitologica*, 50(1), 32-48.
- Kearn, G. Cl. (2018). Reproduction in the Platyhelminthes (Flatworms). Em: Kearn, G. C. *Encyclopedia of Reproduction*. [S. l.]: Elsevier, 498-507.
- Khater, H., Govindarajan, M., & Benelli, G. (2017). Natural Remedies in the Fight Against Parasites. [S. l.]: InTech, E-book. Disponível em 10.5772/63275.
- Kim, K. H., Ahn, K. J., & Kim, C. S. (2001). Seasonal abundances of *Prosomicrocotyla gotoi* (Monogenea) and *Opecoelus sphaericus* (Digenea) from greenlings *Hexagrammos otakii* in a southern coastal area in Korea. *Aquaculture*, 192(2-4), 147-153.
- Kim, S. S., & Kim, S. (2004). Pyrolysis characteristics of polystyrene and polypropylene in a stirred batch reactor. *Chemical Engineering Journal*, 98(1-2), 53-60. [https://doi.org/10.1016/s1385-8947\(03\)00184-0](https://doi.org/10.1016/s1385-8947(03)00184-0).
- Koetsier, G., & Cantor, E. (2019). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers.
- Kounna, C., Fountoulaki, E., Miliou, H., & Chatzifotis, S. (2021). Water temperature effects on growth performance, proximate body and tissue composition, morphometric characteristics and gastrointestinal evacuation processes of juvenile meagre, *Argyrosomus regius* (Asso 1801). *Aquaculture*, 540, 736683. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736683>.
- Krkošek, M. (2010). Host density thresholds and disease control for fisheries and aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 21-32. <https://doi.org/10.3354/aei00004>.
- Kružić, N., Mustać, B., Župan, I., & Čolak, S. (2016). Meagre (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) aquaculture in Croatia. *Croatian Journal of Fisheries*, 74(1), 14-19. <https://doi.org/10.1515/cjf-2016-0003>.
- Lackenby, J. A., Chambers, C. B., Ernst, I., & Whittington, I. D. (2007). Effect of water temperature on reproductive development of *Benedenia seriola* (Monogenea: Capsalidae) from *Seriola lalandi* in Australia. *Diseases of aquatic organisms*, 74(3), 235-242. <https://doi.org/10.3354/dao074235>.

- Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (2009). Parasitic castration: the evolution and ecology of body snatchers. *Trends in parasitology*, 25(12), 564-572. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.09.003>.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62). <https://doi.org/10.3791/3923>.
- Löhmus, M., Björklund, M. (2015). Climate change: what will it do to fish—parasite interactions?. *Biological Journal of the Linnean Society*, 116(2), 397-411. <https://doi.org/10.1111/bij.12584>.
- 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 system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 219, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.02.002>.
- Longo, S. B., Clark, B., York, R., & Jorgenson, A. K. (2019). Aquaculture and the displacement of fisheries captures. *Conservation Biology*, 33(4), 832-841. <https://doi.org/10.1111/cobi.13295>.
- López-Mas, L., Claret, A., Reinders, M. J., Banovic, M., Krystallis, A., & Guerrero, L. (2021). Farmed or wild fish? Segmenting European consumers based on their beliefs. *Aquaculture*, 532, 735992. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735992>.
- Lucius, R., & Poulin, R. (2017). General aspects of parasite biology. (1. ed.). [S. l.]: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 94
- Maciel, P. O., Alves, R. R. (2018). Methods for quantifying eggs and oviposition rate of *Dawestrema cycloancistrum* (Monogenea: Dactylogyridae), monogenean parasite of *Arapaima gigas* (Teleostei: Osteoglossidae). *Journal of Helminthology*, 94, 1–5. <https://doi.org/10.1017/s0022149x18000901>.
- Maciel, P. O., Muniz, C. R., & Alves, R. R. (2017). Eggs hatching and oncomiracidia lifespan of *Dawestrema cycloancistrum*, a monogenean parasitic on *Arapaima gigas*. *Veterinary parasitology*, 247, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.022>.
- Máková, S., Dolezelova, P., Pistekova, V., Svobodova, Z., Bedanova, I., & Voslarova, E. (2008). Comparison of acute toxicity of 2-phenoxyethanol and clove oil to juvenile and embryonic stages of *Danio rerio*. *Neuroendocrinology Letters*, 29(5), 680. <https://doi.org/10.2754/avb201079040587>.
- Magnadottir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology*, 12(4), 361-379. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>.
- Makesh, M., Das, S., & Jithendran, K. P. (2015). Diseases of Brackishwater Finfishes. *Dr. KK Vijayan*, 31.
- Marchiori, N., Tancredo, K., Roumbedakis, K., Gonçalves, E. L., Pereira Jr, J., & Martins, M. L. (2013). New technique for collecting eggs from monogenean parasites. *Experimental parasitology*, 134(2), 138-140. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.02.011>.
- Meagre (*Argyrosomus Regius*) - Akvatek Aquaculture Inc. (n.d.). Akvatek Aquaculture Inc. <https://akvatek.com.tr/en/product/meagre-argyrosomus-regius/>

Mello, G. L. D., Jerônimo, G. T., Tancredo, K. R., Brol, J., Almeida, E. J. D., Martins, M. L., & Tsuzuki, M. Y. (2015). Development and health status of *Centropomus undecimalis* parasitized by *Rhabdosynochus rhabdosynochus* (Monogenea) under different salinity and temperature conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24(3), 350-356. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612015062>.

Mendlová, M., & Šimková, A. (2014). Evolution of host specificity in monogeneans parasitizing African cichlid fish. *Parasites & Vectors*, 7(1), 69. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-69>.

Militz, T. A., Southgate, P. C., Carton, A. G., & Hutson, K. S. (2014). Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 37(5), 451-461. <https://doi.org/10.1111/jfd.12129>.

Millán-Cubillo, A. F., Martos-Sitcha, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Cárdenas, S., & Mancera, J. M. (2016). Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture*, 451, 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.034>.

Mitiku, M. A. (2017). Parasite species richness of fish ponds and fingerling sources in centrak Ethiopia: It's implication on aquaculture development. (Dicertação de Doutorado - *University of Natural Resources and Life Sciences*).

Mohanty, B., Ganguly, S., Mahanty, A., Mitra, T., Patra, S., Karunakaran, D. Mathew, S., Chakraborty, K., Paul, B., Sarma, D., Dayal, J., Singh, S., & Ayyappan, S. (2019). Fish in human health and nutrition. *Narendra Publishing House*, 189-218.

Morales-Nin, B., Geffen, A. J., Pérez-Mayol, S., Palmer, M., González-Quirós, R., & Grau, A. (2012). Seasonal and ontogenic migrations of meagre (*Argyrosomus regius*) determined by otolith geochemical signatures. *Fisheries research*, 127, 154-165. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.02.012>.

Morales-Serna, F. N., Chapa-López, M., Martínez-Brown, J. M., Ibarra-Castro, L., Medina-Guerrero, R. M., & Fajer-Ávila, E. J. (2018). Efficacy of praziquantel and a combination anthelmintic (Adepto®) in bath treatments against *Tagia ecuadori* and *Neobenedenia melleni* (Monogenea), parasites of bullseye puffer fish. *Aquaculture*, 492, 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.043>.

Mylonas, C. C., Mitrizakis, N., Papadaki, M., & Sigelaki, I. (2013). Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. *Aquaculture*, 414-415, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.009>.

O'Dwyer, K., Dargent, F., Forbes, M. R., & Koprivnikar, J. (2019). Parasite infection leads to widespread glucocorticoid hormone increases in vertebrate hosts: A meta-analysis. *Journal of Animal Ecology*, 89(2), 519–529. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13123>.

Ogawa, K. (2014). Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). *Parasitology*, 142(1), 178-195. <https://doi.org/10.1017/s0031182014000808>.

Ohhashi, Y., Yoshinaga, T., & Ogawa, K. (2007). Involvement of host recognition by oncomiracidia and post-larval survivability in the host specificity of *Heterobothrium okamotoi*

(Monogenea: Diclidophoridae). *International journal for parasitology*, 37(1), 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.09.005>.

Paladini, G., Longshaw, M., Gustinelli, A., & Shinn, A. P. (2017). Parasitic diseases in aquaculture: their biology, diagnosis and control. Diagnosis and control of diseases of fish and shellfish. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 37-107. <https://doi.org/10.1002/9781119152125.ch4>.

Papadakis, I. E., Kentouri, M., Divanach, & P., Mylonas, C. C. (2018). Ontogeny of the eye of meagre (*Argyrosomus regius*) from hatching to juvenile and implications to commercial larval rearing. *Aquaculture*, 484, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.038>.

Patterson, J. E., & Ruckstuhl, K. E. (2013). Parasite infection and host group size: a meta-analytical review. *Parasitology*, 140(7), 803-813. <https://doi.org/10.1017/s0031182012002259>.

Pereira, B. P., Vieira, M., Pousão-Ferreira, P., Candeias-Mendes, A., Barata, M., Fonseca, P. J., & Amorim, M. C. P. (2020). Sound production in the Meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801): intraspecific variability associated with size, sex and context. *PeerJ*, 8, e8559. <https://doi.org/10.7717/peerj.8559>.

Pimentel-Acosta, C. A., Morales-Serna, F. N., Chávez-Sánchez, M. C., Lara, H. H., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N., & Fajer-Ávila, E. J. (2019). Efficacy of silver nanoparticles against the adults and eggs of monogenean parasites of fish. *Parasitology research*, 118(6), 1741-1749. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06315-9>.

Pironet, F. N., & Jones, J. B. (2000). Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian dhufish. *Aquaculture International*, 8(4), 349-361.

Plaisance, L., Rousset, V., Morand, S., Littlewood, D. T. J. (2007). Colonization of Pacific islands by parasites of low dispersal ability: phylogeography of two monogenean species parasitizing butterflyfishes in the South Pacific Ocean. *Journal of Biogeography*, 35, 76-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01794.x>.

Poulin, R., & Leung, T. L. F. (2010). Taxonomic resolution in parasite community studies: are things getting worse?. *Parasitology*, 137(13), 1967. <https://doi.org/10.1017/s0031182010000910>.

Pugachev, O., Galli, P., & Kritsky, D. (2010). Guide to monogenoidea of freshwater fish of palaearctic and Amur regions. (1. ed.). Milano: Ledizioni LediPublishing, 300.

Pulkkinen, K., Suomalainen, L. R., Read, A. F., Ebert, D., Rintamäki, P., & Valtonen, E. T. (2010). Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1681), 593-600. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1659>.

Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors*, 18(4), 1271. <https://doi.org/10.3390/s18041271>.

Rani, K., & Upadhyay, S. (2019). Parasitology, Taxonomy and Bioecology - An Introduction of Monogenean Parasites of Fishes: Taxonomy and Parasitocoenosis. New Delhi: Dr. Sushil Kumar Upadhyay. 84-99

Reed, P., Francis-Floyd, R., Klinger, R., & Petty, D. (2012). Monogenean parasites of fish. Fisheries and aquatic sciences. University of Florida UF, IFAS Extension. FA28, USA, 4, 1-4.

- Repullés-Albelda, A., Kostadinova, A., Raga, J. A., & Montero, F. E. (2013). Seasonal population dynamics of *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) parasitising *Seriola dumerili* (Carangidae) in the Western Mediterranean. *Veterinary Parasitology*, 193(1-3), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.013>.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>.
- Reverter, M., Cutmore, S. C., Bray, R., Cribb, T. H., & Sasal, P. (2016). Gill monogenean communities (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) of butterflyfishes from tropical Indo-West Pacific Islands. *Parasitology*, 143(12), 1580-1591. <https://doi.org/10.1017/s0031182016001463>.
- Robar N, Burness G, & Murray D. L. (2010). Tropics, trophics and taxonomy: the determinants of parasite-associated host mortality. *Oikos* 119: 1273–1280. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.18292.x>.
- Roberts, L. S., Janovy, J. J., & Nadler, S. (2012). Foundations of Parasitology (9a ed.). McGraw-Hill Education.
- Rodríguez-González, A., Sarabeev, V., Balbuena, J. A. (2017). Evolutionary morphology in shape and size of haptor anchors in 14 *Ligophorus* spp. (Monogenea: Dactylogyridae). *PloS one*, 12(5), 1-15.
- Rubio-Godoy, M., & Tinsley, R. C. (2008). Transmission dynamics of *Discocotyle sagittata* (Monogenea) in farmed rainbow trout interpreted from parasite population age structure. *Aquaculture*, 275(1-4), 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.023>.
- Saavedra, M., Pereira, T. G., Candeias-Mendes, A., Carvalho, L., Pousão-Ferreira, P., & Conceição, L. E. C. (2018). Effect of increased dietary protein level in meagre (*Argyrosomus regius*) juvenile growth and muscle cellularity. *Aquaculture Nutrition*, 24(3), 1153–1159. <https://doi.org/10.1111/anu.12654>.
- Santos, M., Soares, F., Moreira, M., & Beirão, J. (2018). Evaluation of different extenders for the cold storage of meagre (*Argyrosomus regius*) semen. *Aquaculture Research*, 49(8), 2723–2731. <https://doi.org/10.1111/are.13733>.
- Shah, H. B., Yousuf, A. R., Chishti, M. Z., & Ahmad, F. (2013). Seasonal changes in infrapopulations of *Diplozoon kashmirensis* Kaw, 1950 (Monogenea: Diplozoidae) along a eutrophic gradient. *Parasitology research*, 112(9), 3347-3356. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3514-0>.
- Shamsi, S. (2019). Seafood-borne parasitic diseases: a “one-health” approach is needed. *Fishes*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.3390/fishes4010009>.
- Shvydka, S., Cadarso-Suárez, C., Ballová, D., & Sarabeev, V. (2020). Patterns of monogenean abundance in native and invasive populations of *Planiliza haematocheila* (Teleostei: Mugilidae): interactions between climate and host defence mechanisms explain parasite release. *International Journal for Parasitology*, 50(12), 1023-1031. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.008>.
- Sitjà-Bobadilla, A., de Felipe, M. C., & Alvarez-Pellitero, P. (2006). In vivo and in vitro treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills

of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261(3), 856-864. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.012>.

Sitjà-Bobadilla, A., Redondo, M., Álvarez-Pellitero, M. (2010). Occurrence of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Polyopisthocotylea) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) from different mariculture systems in Spain. *Aquaculture Research*, 41(6), 939-944. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02369.x>.

Soares, F., Roque, A., & Gavaia, P. J. (2018). Review of the principal diseases affecting cultured meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture Research*, 49(4), 1373-1382. <https://doi.org/10.1111/are.13613>.

Soberon, L., Mathews, P., & Malherios, A. (2014). Hematological parameters of *Colossoma macropomum* naturally parasitized by *Anacanthorus spathulatus* (Monogenea: Dactylogiridae) in fish farm in the Peruvian Amazon. *International Aquatic Research*, 6(4), 251-255. <https://doi.org/10.1007/s40071-014-0087-1>.

Stentiford, G. D., Sritunyaluksana, K., Flegel, T. W., Williams, B. A., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., & Bass, D. (2017). New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis. *PLoS Pathogens*, 13(2), e1006160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>.

Stewart, J., Hughes, J. M., Stanley, C., & Fowler, A. M. (2020). The influence of rainfall on recruitment success and commercial catch for the large sciaenid, *Argyrosomus japonicus*, in eastern Australia. *Marine Environmental Research*, 157, 104924. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104924>.

Stipa, P., & Angelini, M. (2005). FAO Fisheries & Aquaculture *Argyrosomus regius*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en#tcNA00E7.

Stratev, D., Zhelyazkov, G., Noundou, X. S., & Krause, R. W. (2018). Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquaculture International*, 26(1), 289-308. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0219-x>.

Strona, G., Stefani, F., & Galli, P. (2010). Monogenoidean parasites of Italian marine fish: An updated checklist. *Italian Journal of Zoology*, 77(4), 419-437. <https://doi.org/10.1080/11250001003614841>.

Suzer, C., Kamacı, H. O., Çoban, D., Yıldırım, Ş., Firat, K., & Saka, Ş. (2012). Functional changes in digestive enzyme activities of meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) during early ontogeny. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(4), 967-977.

Tankeshwar, A. (2021). Microbe Online. Find People – Resources. Acesso a 26 outubro de 2021, em <https://people.wou.edu/~courtina/ch462/Gel%20Electrophoresis.pdf>.

Tavares-Dias, M., & Martins, M. L. (2017). An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(4), 913-918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>.

Tinsley, R. C., York, J. E., Everard, A. L., Stott, L. C., Chapple, S. J., & Tinsley, M. C. (2011). Environmental constraints influencing survival of an African parasite in a north temperate habitat: effects of temperature on egg development. *Parasitology*, 138(8), 1029-1038. <https://doi.org/10.1017/s0031182011000461>.

- Tokşen, E., Tanrikul, T.T., Balta, F., & Koyuncu, E. (2010). Treatment Trials Of Parasites Of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) and SeaBream (*Sparus Aurata*) in Turkey.
- Tsertou, M. I., Smyrli, M., Kokkari, C., Antonopoulou, E., & Katharios, P. (2018). The aetiology of systemic granulomatosis in meagre (*Argyrosomus regius*): The “Nocardia” hypothesis. *Aquaculture Reports*, 12, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.08.002>.
- Tubbs, L. A., Poortenaar, C. W., Sewell, M. A., & Diggles, B. K. (2005). Effects of temperature on fecundity in vitro, egg hatching and reproductive development of *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae* (Monogenea) parasitic on yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *International Journal for Parasitology*, 35(3), 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.11.008>.
- Turgut, E. (2012). Influence of temperature and parasite intensity on egg production and hatching of the monogenean *Dactylogyrus extensus*. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*. 64. <https://doi.org/10.46989/001c.20625>.
- Umeda, N., & Hirazawa, N. (2004). Response of the Monogenean *Neobenedenia girellae* to Low Salinities. *Fish Pathology*, 39(2), 105–107. <https://doi.org/10.3147/jsfp.39.105>.
- Valenti, W. C., Kimpara, J. M., & de L Preto, B. (2011). Measuring aquaculture sustainability. *World aquaculture*, 42(3), 26–30.
- Vallés Bueno, R. (2013). Reproducción en cautividad y cultivo larvario de la corvina (*Argyrosomus regius*) (Dissertação de Doutoramento, Universitat de Barcelona).
- Vaughan, D., & Chisholm, L. (2010). *Heterocotyle tokoloshei* sp. nov. (Monogenea, Monocotylidae) from the gills of *Dasyatis brevicaudata* (Dasyatidae) kept in captivity at Two Oceans Aquarium, Cape Town, South Africa: Description and notes on treatment. *Acta Parasitologica*, 55(2). <https://doi.org/10.2478/s11686-010-0018-2>.
- Vignon, M. (2011). Inference in morphological taxonomy using collinear data and small sample sizes: Monogenean sclerites (Platyhelminthes) as a case study. *Zoologica Scripta*, 40(3), 306–316. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00470.x>.
- Whittington, I. D., Cribb, B. W., Hamwood, T. E., & Halliday, J. A. (2000). Host-specificity of monogenean (platyhelminth) parasites: a role for anterior adhesive areas?. *International Journal for Parasitology*, 30(3), 305–320. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00006-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00006-0).
- Whittington, I. D., & Kearn, G. C. (2011). Hatching strategies in monogenean (Platyhelminth) parasites that facilitate host infection. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 91–99. <https://doi.org/10.1093/icb/icr003>.
- Williams, A. (1989). Some monogenean parasites of the genera *Calceostoma* van Beneden, 1852 and *Diplectanum* Diesing, 1858 from *Argyrosomus hololepidotus* (Lacepède, 1802) (Sciaenidae: Teleostei) in western Australia. *Systematic Parasitology*, 14(3), 187–201. <https://doi.org/10.1007/bf02187053>.
- Williams, M., Hernandez-Jover, M., & Shamsi, S. (2020). Fish substitutions which may increase human health risks from zoonotic seafood borne parasites: A review. *Food Control*, 107429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107429>.
- Zargar, U. R., Chishti, M. Z., Yousuf, A. R., & Fayaz, A. (2012). Infection level of monogenean gill parasite, *Diplozoon kashmirensis* (Monogenea, Polyopisthocotylea) in the Crucian Carp, *Carassius carassius* from lake ecosystems of an altered water quality: What factors do have an

impact on the Diplozoon infection?. *Veterinary Parasitology*, 189(2-4), 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.029>.

Zhang, X. P., Shang, B. D., Wang, G. T., Li, W. X., Yang, X., & Li, Z. Y. (2015). The effects of temperature on egg laying, egg hatching and larval development of *Dactylogyrus vastator*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 39(6). 1178-1189. 10.7541/2015.154.

Zhang, X., Shang, B., Cheng, Y., Wang, G., & Li, W. (2021). Effects of Different Strategies of Low Temperature on Egg Hatching of *Dactylogyrus vastator* (Monogenea: Dactylogyridae). *Research Square*. 2-9. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-560786/v1>.

Zhou, Z. H., Li, Y. Z., Liu, L., Ding, X. J., & Yuan, K. (2020). *Paracaesicola nanshaensis* n. gen., n. sp. (Monogenea, Microcotylidae) a gill parasite of *Paracaesio sordida* (Teleostei, Lutjanidae) from the South China Sea. *Parasite (Paris, France)*, 27, 33. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020031>.

Zupa, R., Martino, N. A., Marzano, G., Dell'Aquila, M. E., & Corriero, A. (2020). Meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) Stem Spermatogonia: Histological Characterization, Immunostaining, In Vitro Proliferation, and Cryopreservation. *Animals*, 10(5), 851. <https://doi.org/10.3390/ani10050851>.

8. Anexo

Anexo I - Número de ovos produzidos por uma única *oncomiracidium* de *Calceostoma glandulosum* em *A. regius* para determinar a fecundidade do parasita e quando a maturação sexual era atingida

Hospedeiro	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	0	0	0	0	11	48	195	238	540	301	663	313	65	14	0	0	0
2	0	1	2	8	26	10	38	8	9	10	2	0	Morreu				
3	0	0	0	13	Morreu												
4	0	0	0	0	2	17	49	128	233	94	56	11	1	0	0	0	0
5	0	1	1	1	Morreu												
6	0	1	0	0	2	14	81	194	365	471	320	197	49	23	5	0	0
Nº Ovos/ Peixe	0	0,1	0,1	0,6	1,7	3,7	15,1	23,7	47,8	36,5	43,4	21,7	6,4	2,1	0,3	0	0
DP	0	0,1	0,1	0,8	1,6	2,5	10,4	14,5	32,3	30	43,6	21,9	4,5	1,6	0,4	0	0

Anexo II - Percentagem (%) da ocorrência de ovos de *Calceostoma glandulosum* nas diferentes fases de desenvolvimento do embrião: Fase I - não embrionado; Fase II - embrionado; Fase III - em desenvolvimento; Fase IV - eclodido

	Temperatura (°C)		
	14	16	17
Fase I	84%	62%	28%
Fase II e III	14%	29%	58%
Fase IV	2%	8%	14%