

***Ensaios em time course com patógenos bacterianos em
dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*)***

Beatriz Isabel Soares do Carmo

[2020]

***Ensaio em time course com patógenos bacterianos em
dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*)***

Beatriz Isabel Soares do Carmo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Especialista Teresa Baptista e coorientação do
Doutor Benjamín Costas

[2020]

Ensaio em *time course* com patógenos bacterianos em dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*)

Copyright © Beatriz Isabel Soares do Carmo

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

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.

Resumo

Na aquacultura, os patógenos de origem bacteriana estão entre as principais causas de perdas económicas. Entre estes patógenos, destacam-se a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e o *Vibrio anguillarum*, agentes etiológicos da pasteurelose e da vibriose, respetivamente. Para a aplicação de medidas de prevenção e controlo das patologias que afetam a aquacultura, é necessário o estudo da interação entre os hospedeiros e os agentes patogénicos. Foram efetuados três ensaios *time course* no edifício CETEMARES (Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal), que consistiram na infeção intraperitoneal de indivíduos de dourada de diferentes pesos ($40 \pm 7,30$ g e $9,8 \pm 2,20$ g) com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (10^5 UFC g⁻¹) e a infeção de indivíduos de robalo ($25,5 \pm 8,18$ g) com *V. anguillarum* (10^6 UFCg⁻¹). Foi realizada uma amostragem de 12 indivíduos antes da infeção (0H) e os indivíduos de restantes foram selecionados aleatoriamente, e infetados com de PBS (grupo de controlo) e 100 µL de bactéria (grupo de infeção), e distribuídos em seis sistemas de recirculação (triplicados para cada condição). Foram amostrados dois indivíduos por tanque (n=6) às 3H, 6H, 9H, 24H, 48H e tempo final, após a infeção. Os parâmetros amostrados foram para a análise hematológica, resposta imune e stress oxidativo.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tempos de amostragem na grande maioria dos parâmetros estudados. Comparando as interações dos indivíduos de dourada de diferentes pesos com a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, estas demonstraram diferentes respostas à infeção, principalmente na mortalidade, hematócrito, hemoglobina e catalase, e os indivíduos de maior peso demonstraram uma resposta mais eficaz à infeção, como observado nos valores de neutrófilos e monócitos. Na interação entre os indivíduos de robalo e o *Vibrio anguillarum*, foi possível observar-se a interação da bactéria com o organismo principalmente ao nível dos parâmetros hematológicos, principalmente nos valores de eritrócitos, hematócrito, neutrófilos, monócitos e linfócitos. Em estudos futuros, propõe-se o estudo da interação de patógenos bacterianos com diferentes espécies de peixe em fases distintas do ciclo de vida, de modo a observar as diferenças na interação com o patógeno, a determinação de outros parâmetros de resposta imune, como a atividade bactericida e atividade do complemento, a recolha de órgãos alvos dos patógenos para análise histológica e/ou imunohistoquímica e a avaliação do efeito modulatório da infeção experimental na expressão de genes pro e anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Aquacultura, Hematologia, Patologia, Resposta imune, Stress oxidativo, *Time course*.

Abstract

In aquaculture, pathogens of bacterial origin are among the main causes of economic losses. Among these pathogens, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Vibrio anguillarum* stand out, the etiological agents of pasteurellosis and vibriosis, respectively. For the application of measures to prevent and control pathologies affecting aquaculture, it is necessary to study the interaction between hosts and pathogens. Three *time course trials were carried out in* the CETEMARES building (Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal), which consisted of intraperitoneal infection of sea bream individuals of different weights (40 ± 7.30 g and 9.8 ± 2.20 g) with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (10^5 CFU g⁻¹) and the infection of bass individuals (25.5 ± 8.18 g) with *V. anguillarum* (10^6 UFCg⁻¹). Twelve individuals were sampled before infection (0H) and the remaining individuals were randomly selected, infected with PBS (control group) and 100 µL of bacteria (infection group), and distributed in six recirculation systems (triplicates for each condition). Two individuals were sampled per tank (n=6) at 3H, 6H, 9H, 24H, 48H and final time after infection. The parameters sampled were for hematological analysis, immune response, and oxidative stress.

Statistically significant differences were observed between the different sampling times in most of the studied parameters. Comparing the interactions of sea bream individuals of different weights with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, these demonstrated different responses to the infection, mainly in mortality, hematocrit, hemoglobin and catalase, and the higher weight individuals demonstrated a more effective response to the infection, as observed in the values of neutrophils and monocytes. In the interaction between sea bass individuals and *Vibrio anguillarum*, it was possible to observe the interaction of the bacterium with the organism mainly at the level of hematological parameters, especially in the values of erythrocytes, hematocrit, neutrophils, monocytes and lymphocytes. In future studies, it is proposed the study of the interaction between bacterial pathogens and different fish species in different phases of the life cycle, in order to observe the differences in interaction with the pathogen, the determination of other parameters of immune response, such as bactericidal activity and complement activity, the collection of target organs of pathogens for histological and/or immunohistochemical analysis and the evaluation of the modulatory effect of experimental infection on the expression of pro and anti-inflammatory genes.

Keywords: Aquaculture, Haematology, Immune response, Oxidative Stress, Pathology, Time course.

Índice

1. Introdução	1
2. Materiais e métodos	10
3. Parâmetros analíticos.....	12
3.1. Parâmetros hematológicos.....	12
3.2. Parâmetros de resposta imune.....	13
3.3. Parâmetros de <i>stress</i> oxidativo	14
4. Análise estatística	16
5. Resultados	17
5.1. Mortalidade	17
5.2. Hematologia	18
5.3. Resposta imune	25
5.4. <i>Stress</i> oxidativo.....	27
6. Discussão.....	31
6.1. Ensaio A e B.....	31
6.2. Ensaio C	35
7. Considerações finais e trabalhos futuros	38
8. Referências	39

Índice de Figuras

Figura 1: Capturas e produção de aquacultura mundiais (FAO, 2020).	1
Figura 2: Espécies mais produzidas em Portugal, em 2019 (Agência Portuguesa do Ambiente, 2019).....	2
Figura 3: Equações para o cálculo do: a) MCV (μm^3), b) MCH (pg célula^{-1}) e c) MCHC ($\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$).....	13
Figura 4: Mortalidade cumulativa dos ensaios: a) infeção de <i>Sparus aurata</i> com peso médio de $40 \pm 7,30$ g com <i>Phdp</i> , b) infeção de <i>Sparus aurata</i> com peso médio de $9,8 \pm 2,20$ g com <i>Phdp</i> e c) infeção de <i>D. labrax</i> com peso médio de $25,5 \pm 8,18$ g com <i>V. anguillarum</i>	17
Figura 5: Valores (média \pm desvio-padrão) da: a) atividade da peroxidase * (OD 450 nm), e b) tripsina inibida (%) dos indivíduos do ensaio A ($n = 6$), com douradas (<i>Sparus aurata</i>) com peso médio de $40 \pm 7,30$ g. As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$	25
Figura 6: Valores (média \pm desvio-padrão): a) da atividade da peroxidase (OD 450 nm) e b) da tripsina inibida dos indivíduos do ensaio B com douradas (<i>Sparus aurata</i>) com peso médio de $9,8 \pm 2,20$ g ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey. Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$	26
Figura 7: Valores (média \pm desvio-padrão): a) da atividade da peroxidase (OD 450 nm), b) da tripsina inibida* (%), e c) das proteases (% tripsina não inibida) do ensaio C com robalos (<i>Dicentrarchus labrax</i>) com peso médio de $25,5 \pm 8,18$ g ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$	27

Figura 8: Atividade da catalase (média \pm desvio-padrão), expressa em U mg proteína⁻¹, obtida através de amostras do ensaio A com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de 40 \pm 7,30 g (n = 6). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey. Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, p < 0,05.28

Figura 9: Valores (média \pm desvio padrão) da: a) atividade da SOD, expressa em U mg proteína⁻¹; b) atividade da catalase, expressa em U mg proteína⁻¹; c) peroxidação lipídica (LPO)*, expresso em nmol TBARS g⁻¹; d) atividade da GST, expressa em mU mg⁻¹; e e) atividade da tGSH, expressa em μ M mg proteína⁻¹ do ensaio B com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de 9,8 \pm 2,20 g (n = 6). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Pairwise). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, p < 0,05. .29

Figura 10: Valores (média \pm desvio padrão) da: a) atividade da SOD, expressa em U mg proteína⁻¹; b) atividade da catalase ^{α} , expressa em U mg proteína⁻¹; c) peroxidação lipídica (LPO)*, expresso em nmol TBARS g⁻¹; d) atividade da GST, expressa em mU mg⁻¹; e e) atividade da tGSH*, expressa em μ M mg proteína⁻¹ do ensaio C com robalos (*Dicentrarchus labrax*) com peso médio de 25,5 \pm 8,18 g (n = 6). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Pairwise; ^{α} , Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, p < 0,05.30

Índice de Tabelas

Tabela 1: Valores (média \pm desvio-padrão) de: leucócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), eritrócitos* ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), hematócrito (%), hemoglobina (g dL^{-1}), MCV (μm^3), MCH (pg cel^{-1}), MCHC ($\text{g } 100\text{mL}^{-1}$), neutrófilos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), monócitos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) e trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), do ensaio A com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de $40 \pm 7,30 \text{ g}$ ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$19

Tabela 2: Valores (média \pm desvio-padrão) de: leucócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), eritrócitos* ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), hematócrito (%), hemoglobina (g dL^{-1}), MCV (μm^3), MCH (pg cel^{-1}), MCHC ($\text{g } 100\text{mL}^{-1}$), neutrófilos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), monócitos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) e trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) do ensaio B com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de $9,8 \pm 2,20 \text{ g}$ ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$21

Tabela 3: Valores (média \pm desvio-padrão) de: leucócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), eritrócitos* ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), hematócrito (%), hemoglobina (g dL^{-1}), MCV (μm^3), MCH (pg cel^{-1}), MCHC ($\text{g } 100\text{mL}^{-1}$), neutrófilos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), monócitos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) e trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) do ensaio C com robalos (*Dicentrarchus labrax*) com peso médio de $25,5 \pm 8,18 \text{ g}$ ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$24

Índice de Abreviaturas

ANOVA – Análise de variância

CAT – Catalase

ECP's – Produtos Extracelulares

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

GST – Glutathione S-transferase

LPO – Peroxidação lipídica

MCH – Hemoglobina corpuscular média

MCHC – Concentração da hemoglobina corpuscular média

MCV – Volume corpuscular médio

Phdp – *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

ROS – Espécies de oxigênio reativas

SOD – Superóxido dismutase

tGSH – Glutathione total

1. Introdução

De acordo com o relatório do estado dos recursos pesqueiros e da aquacultura, esta é descrita como o cultivo de animais aquáticos (como peixes, moluscos e crustáceos) e de plantas aquáticas. Trata-se do setor de produção alimentar com crescimento mais rápido, com um crescimento anual de 5,8% no período de 2000-2016 (FAO, 2020) e, em 2030, é expectável que venha a ser a fonte principal de todo o pescado para consumo humano (Fazio, 2019).

Para satisfazer a necessidade de alimento numa população mundial em crescimento, a produção aquícola tem que aumentar de modo a perfazer a diferença entre a procura e demanda, visto que a produção de pescado pelo setor das pescas tem estado estagnada desde a década de 1980 (Ahmed e Thompson, 2019). A produção aquícola de pescado foi de 82,1 milhões de toneladas em 2018 (Figura 1) (FAO, 2020).

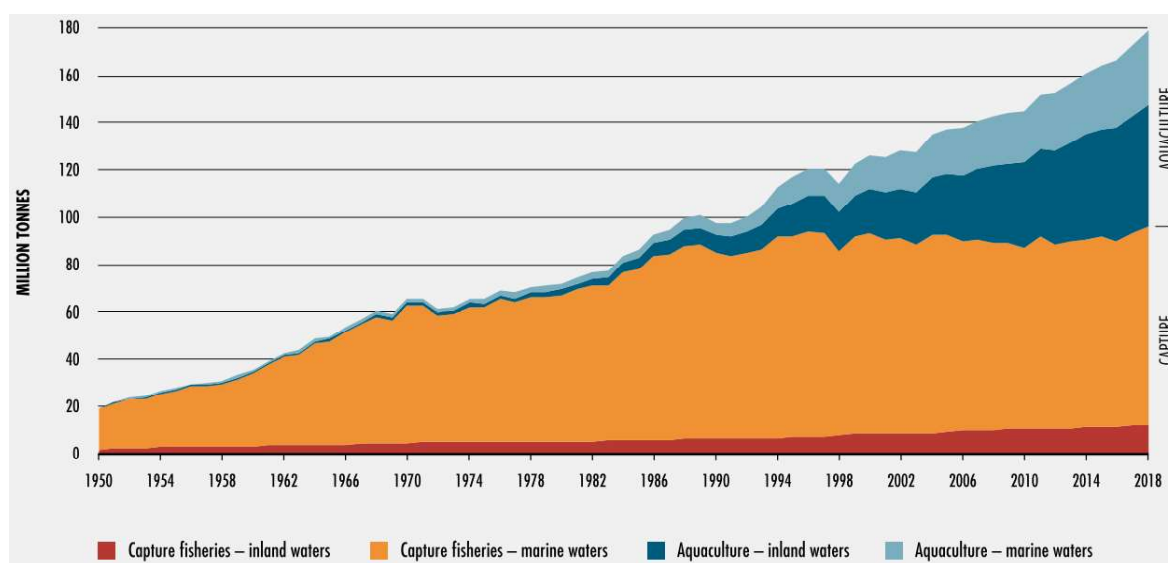


Figura 1: Capturas e produção de aquacultura mundiais (FAO, 2020).

As espécies de peixe mais produzidas em Portugal são o pregado (*Scophthalmus maximus*) (23,2%), a dourada (*Sparus aurata*) (8,8%), o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (5,9%) e o linguado (*Solea* sp.) (1,3%), (Figura 2) (Agência Portuguesa do Ambiente, 2019). A produção aquícola, assim como o seu valor, aumentaram 11,5% e 10,6%, em 2016 e 2017,

respetivamente. Houve um aumento da produção de pregado (*S. maximus*) e de robalo (*D. labrax*), mas um decréscimo da produção de dourada (*S. aurata*) (DGRM e INE, 2019).

Entre as várias espécies de peixes marinhos, a dourada destaca-se pelo seu interesse comercial, importância económica e elevado consumo. Além disso, demonstra vários aspetos biológicos que são favoráveis para a sua produção, tais como ser um organismo eurihalino, viver em comunidade, tolerar elevadas densidades populacionais, e ser uma das principais espécies mediterrânicas produzidas na indústria da aquacultura (Fazio *et al.*, 2013). O cultivo de robalo é muito semelhante ao da dourada, sendo uma espécie cultivada há muitos anos. O seu crescimento é mais lento, mas o seu valor comercial é mais elevado. No entanto, ao contrário da dourada, o seu manuseamento é mais difícil, pois entram em *stress* com facilidade, são sensíveis à luz e demonstram um comportamento mais agressivo (Ortega, 2013).

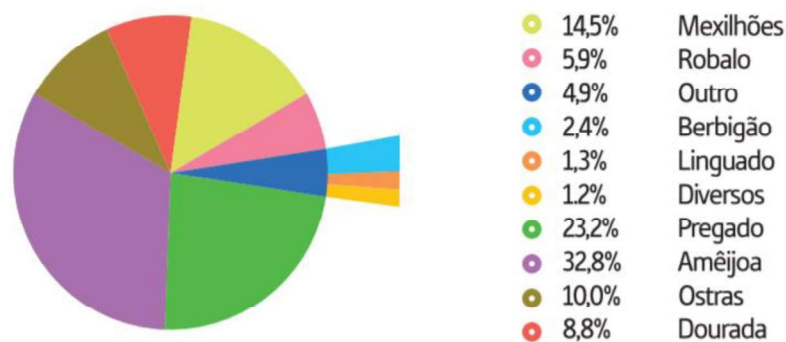


Figura 2: Espécies mais produzidas em Portugal, em 2019 (Agência Portuguesa do Ambiente, 2019).

Os surtos patológicos podem ser de origem bacteriana, viral, parasítica ou fúngica (Dadar *et al.*, 2017), estando os patógenos bacterianos entre as principais causas de perdas económicas em aquaculturas (Akayli *et al.*, 2018). Os principais patógenos bacterianos que afetam a dourada e o robalo são *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas anguilliseptica* (Toranzo *et al.*, 2005) e *Tenacibaculum maritimum* (FAO, 2017).

A ocorrência e desenvolvimento de uma patologia é o resultado da interação entre o agente patogénico, o hospedeiro e o ambiente (Snieszko, 1974). Para a aplicação de medidas

de prevenção e controlo das patologias que afetam a aquacultura, é necessário o estudo da biologia dos hospedeiros e das características dos microrganismos patogénicos para os peixes, assim como a compreensão dos fatores ambientais que os afetam (Toranzo *et al.*, 2009).

Devido à sua importância e impacto na aquacultura, as bactérias utilizadas neste estudo foram *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (*Phdp*) e *Vibrio anguillarum*, bactérias causadoras da fotobacteriose e vibriose, respetivamente. A fotobacteriose tem vindo a causar problemas graves na aquacultura de várias espécies no mar Mediterrâneo (Costa *et al.*, 2017; Essam *et al.*, 2015), sendo um fator limitante da produção de dourada e de robalo (Romalde, 2002). *V. anguillarum* é o agente causador da vibriose, uma septicémia hemorrágica fatal que resulta em elevadas perdas económicas (Shefat, 2019).

O agente etiológico que causa a fotobacteriose é a *Phdp*, uma bactéria Gram-negativa da família Vibrionaceae, anaeróbia facultativa, sem mobilidade, originalmente isolada num surto em *Roccus americanus*, em Chesapeake Bay, EUA (Snieszko *et al.*, 1964). A temperatura ótima de cultivo desta bactéria é entre 22,5-30°C (Romalde, 2002). A presença desta bactéria em Portugal foi descrita pela primeira vez em 1996, tendo sido isolada em dourada (Baptista *et al.*, 1996). Esta patologia é reconhecida como sendo ameaçadora para a produção de aquacultura marinha mundial, devido à grande variedade de organismos hospedeiros, como o robalo (*D. labrax*), dourada (*S. aurata*) e linguado (*Solea* spp.) no Mediterrâneo, híbrido de “striped bass” (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*) nos Estados Unidos (Bakopoulos *et al.*, 2004) e *Seriola quinqueradiata* no Japão (Toranzo, 2004; Vale *et al.*, 2003). Esta bactéria causa elevadas taxas de mortalidade, tem ampla distribuição geográfica e uma elevada resistência a antibióticos (Costas *et al.*, 2013; Vale *et al.*, 2005). Existem algumas vacinas vivas atenuadas e bacterinas de proteínas membranares ou citoplásmicas que proporcionam proteção limitada contra este patógeno, mas que têm um elevado custo de produção (Eto *et al.*, 2019).

Em temperaturas baixas, os peixes podem ser portadores do patógeno como uma infeção subclínica durante longos períodos de tempo (Toranzo *et al.*, 2005). Para além da temperatura, a qualidade da água de cultivo e o *stress* a que os organismos estão sujeitos influenciam o desenvolvimento da fotobacteriose (Avci *et al.*, 2013). Esta patologia apresenta uma forma aguda, que se manifesta numa septicémia grave, e uma forma crónica,

caracterizada pela presença de pontos brancos que consistem em acumulações bacterianas no espaço intersticial (Avci *et al.*, 2013; Thune *et al.*, 1993), particularmente no rim e no baço (Toranzo *et al.*, 2005). A forma aguda da patologia é a mais comum, em que os indivíduos apresentam também sinais de letargia, perda de equilíbrio, taxas de ventilação elevadas, e são observadas poucas lesões externas nos organismos infetados, independentemente da espécie (Hawke, 2012). Em vários estudos, foram observadas alterações histológicas em peixes infetados com *Phdp*, tais como hemorragias no baço, fígado e rim, necrose no baço, brânquias e fígado, e destruição das lamelas branquiais (Avci *et al.*, 2013; Essam *et al.*, 2016; Mladineo *et al.*, 2006; Poulos *et al.*, 2004; Toranzo *et al.*, 1991).

As capacidades de aderência e invasão das bactérias são ferramentas essenciais nos estágios iniciais de infeção (Romalde, 2002). A *Phdp* foi descrita como possuir fracos mecanismos de adesão às células de defesa dos peixes, mas elevada capacidade de adesão ao intestino dos peixes e são capazes de sobreviver vários dias nas células do hospedeiro e de se propagar para células adjacentes (Romalde, 2002). Os produtos extracelulares (ECP's) são produzidos por bactérias patogénicas para facilitar a captação de nutrientes do ambiente envolvente e para a penetração e sobrevivência do patógeno dentro do hospedeiro. Esta bactéria também secreta ECP's considerados letais para diferentes espécies de peixes e ratos (Magariños *et al.*, 1992). Estes produtos são fatores-chave para a invasão desta bactéria, em particular uma exotoxina (AIP56), que provoca a apoptose de macrófagos e neutrófilos em robalo (Vale *et al.*, 2005). *Phdp* também possui a capacidade de utilizar a hemina e hemoglobina do hospedeiro como fontes de ferro (Magariños *et al.*, 1994). O material capsular de polissacarídeos também é uma parte importante na patogénese desta bactéria, conferindo resistência ao soro e aumentando a mortalidade dos hospedeiros (Andreoni e Magnani, 2014). Estes mecanismos podem provocar a destruição dos tecidos do hospedeiro e hemorragias, tendo um papel importante na colonização, invasão e disseminação do patógeno bacteriano dentro do hospedeiro (Labella *et al.*, 2011).

As bactérias do género *Vibrio* são membros importantes do ambiente marinho, algumas espécies sendo saprófitas, simbióticas ou patogénicas para espécies marinhas ou para o homem (Austin *et al.*, 2005). *Vibrio anguillarum* é uma das espécies da família *Vibrionaceae* que causa patologias de grande importância económica nas aquaculturas marinhas (Toranzo *et al.*, 2005). Trata-se de uma bactéria Gram-negativa e anaeróbia facultativa que apresenta uma forma em vírgula (vibrião) e flagelos polares, não formando esporos (Frans *et al.*, 2011). A temperatura ótima de crescimento deste patógeno é entre os

30°C e 34°C (Guérin-Faubleé *et al.*, 1995). Apesar desta bactéria ser halofílica e crescer em salinidades entre 1-2, a sua motilidade é melhorada com uma salinidade superior (Hickey e Lee, 2018). A infeção ocorre, na maioria dos casos, através da penetração da epiderme dos peixes (Spanggaard *et al.*, 2000), nomeadamente através de ferimentos ou de uma zona danificada da camada mucosa (Frans *et al.*, 2011).

A vibriose afeta um elevado espectro de espécies de águas tanto quentes como frias de elevada importância económica, tais como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), salmão do Pacífico (*Onchorynchus* spp.), truta arco-íris (*O. mykiss*), pregado (*S. maximus*), robalo (*D. labrax*), dourada (*S. aurata*), robalo riscado (*M. saxatilis*), bacalhau (*Gadus morhua*), enguia Europeia (*Anguilla anguilla*), enguia Japonesa (*A. japonica*) e ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Toranzo *et al.*, 2005; Toranzo e Barja, 1990). Além destas espécies, esta patologia afeta também moluscos e camarões (Demircan e Candan, 2006; Frans *et al.*, 2011; Hickey e Lee, 2018). Este patógeno é estritamente marinho, os surtos da patologia ocorrendo apenas em águas marinhas ou salobras, normalmente em áreas temperadas e no verão. A sua ocorrência em águas com temperaturas mais elevadas está relacionada com um aumento da atividade bacteriana e um decréscimo da capacidade imunológica nas populações afetadas, podendo estar também associada ao manuseamento dos indivíduos (Colquhoun e Lillehaug, 2014). Outros fatores que podem despoletar o aparecimento desta doença incluem o *stress* químico, como a qualidade da água e composição da dieta e o *stress* biológico, como a densidade populacional e presença de outros organismos na água de cultivo (Frans *et al.*, 2011).

Em casos agudos da patologia, a propagação da infeção é tão rápida que a maioria dos indivíduos afetados morrem sem apresentar sinais clínicos (Frans *et al.*, 2011). Esta patologia é caracterizada pela ocorrência de septicémia hemorrágica visível na base das barbatanas e boca, exoftalmia e opacidade da córnea (Singh *et al.*, 2014), podendo também ocorrer letargia, perda de apetite, úlceras internas e externas, distensão abdominal, petéquias, necrose, formação de bolhas nos tecidos musculares, mortalidade (Hickey e Lee, 2018) e a acumulação de um líquido viscoso com vestígios de sangue nos intestinos (Akayli *et al.*, 2018). Em vários estudos, foram observadas alterações histopatológicas em peixes infetados com *V. anguillarum*, tais como hemorragias nas brânquias, baço, fígado, músculo e rim, e necrose nos músculos esqueléticos e baço, com degradação grave do epitélio mucoso dos intestinos (Akayli *et al.*, 2018; Roberts, 2012).

Os fatores de virulência do *V. anguillarum* podem ser classificados em três categorias: I – os necessários para a quimiotaxia e mobilidade; II – os necessários para a adesão e invasão; e III – os necessários para a proliferação e persistência bacterianas (Frans *et al.*, 2013). Relativamente à quimiotaxia e mobilidade, esta bactéria possui quimiotaxia para componentes presentes na camada mucosa da pele e do intestino, e um flagelo que lhe atribui movimento ativo (Frans *et al.*, 2011), ambos da categoria I (O'Toole *et al.*, 1996).

Entre os diversos fatores englobados na categoria II, *V. anguillarum* secreta uma metaloprotease com zinco que degrada os tecidos do hospedeiro, resultando nas lesões visíveis em organismos infetados (Hickey e Lee, 2018), e que lhe permite a colonização e penetração do peixe. Possui também hemolisinas bacterianas, exotoxinas que causam a lise de eritrócitos, mastócitos, neutrófilos e células polimorfonucleares (Frans *et al.*, 2011). Quanto aos fatores da categoria III, *V. anguillarum* é resistente à biliar e produz biofilme que aumenta a sua capacidade de se manter viável em condições de *stress* (Hickey e Lee, 2018) e possui um sistema de sequestro de ferro, que lhe permite obter ferro a partir das células do hospedeiro (Weber, 2010).

O estudo das características hematológicas das principais espécies de peixes produzidas é uma ferramenta importante para o desenvolvimento do setor da aquacultura. O perfil hematológico de um peixe de cultivo fornece informação acerca do estado de saúde do peixe (Fazio, 2019) e da qualidade da água em que este se encontra, auxiliando a avaliação da relação entre a saúde do peixe e a qualidade da água, e a determinação da suscetibilidade do organismo às alterações nas condições ambientais (Faggio *et al.*, 2014). A hematologia tem um papel especialmente importante pois trata-se de um método não-letal e de baixo custo, para o diagnóstico de patologias (Fazio, 2019; Satheeshkumar *et al.*, 2012). A identificação da morfologia das células sanguíneas, a determinação do hematócrito (PCV, *packed cell volume*), a obtenção das contagens totais de eritrócitos e leucócitos, e de índices como o volume celular médio, concentração de hemoglobina e média corpuscular de hemoglobina são ferramentas hematológicas úteis no diagnóstico de patologias (Clauss *et al.*, 2008).

Existem cinco principais tipos de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos), cada um com um papel diferente na resposta à presença de organismos ou substâncias externos ao organismo (Erhunmwunse e Ewere, 2014). Os neutrófilos são importantes componentes do sistema inato que protegem o organismo contra

uma infecção microbiana. As funções destas células incluem fagocitose, quimiotaxia e atividade bactericida (Katzenback *et al.*, 2012). Quando ativados os neutrófilos libertam peróxido de hidrogénio e mieloperoxidase. Os linfócitos são o tipo de leucócito mais comum e variável em peixes teleósteos e elasmobrânquios saudáveis, tendo um papel importante na imunidade humoral e mediada por células (Clauss *et al.*, 2008).

Os trombócitos diferem dos vários tipos de leucócitos por possuírem estruturas vesiculares e microtubulares no citoplasma (Silva *et al.*, 2012). Podem ser comparados com as plaquetas sanguíneas nos mamíferos, participando na coagulação sanguínea, prevenindo a perda de sangue por hemorragias (Mazon *et al.*, 2002).

É necessário um conhecimento aprofundado dos mecanismos do sistema imune e células imunitárias envolvidas nas interações entre patógeno e hospedeiro para conhecer e resolver os problemas da aquacultura atual, como patologias emergentes, a utilização de antibióticos, a introdução de novas espécies, alterações climáticas e poluição (Thompson, 2017).

O sistema imune dos peixes teleósteos depende do sistema inato e adquirido, que interagem de modo a proteger o corpo de substâncias exógenas, como microrganismos e toxinas (Biller e Takahashi, 2018). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra infeções ou patologias, possuindo três mecanismos de defesa, barreiras físicas, componentes celulares e humorais. As barreiras físicas previnem a entrada do patógeno, e incluem o muco, pele, brânquias e camada epitelial do sistema gastrointestinal. Os componentes celulares como monócitos, macrófagos, granulócitos, entre outros. Relativamente à componente humoral são mediadas através de macromoléculas libertadas para os fluídos extracelulares após uma infeção por um patógeno, por exemplo lisozima, sistema do complemento e interferão. O sistema imune adaptativo é ativado quando o patógeno persiste no indivíduo infetado, e é composto por componentes celulares e humorais, como células B, anticorpos IgM, IgD e IgW (Smith *et al.*, 2019).

O sistema do complemento é uma parte essencial do sistema imune inato, e consiste numa complexa cascata de enzimas, composto por várias glicoproteínas inativas, que podem ser ativadas por uma das três vias de ativação conhecidas: clássica, alternativa e mediada

por lectinas (Katzenback *et al.*, 2012). É composto por mais do que 35 proteínas solúveis que são expressas no fígado e libertadas no plasma. As funções do sistema do complemento incluem atividade lítica (para vírus, bactérias e parasitas) e neutralização de exotoxinas dos patógenos. As proteínas ativadas podem também fornecer um alerta da presença, no hospedeiro, de potenciais patógenos contribuindo assim para a degradação dos patógenos através do recrutamento de células imunes e através da opsonização (Holland e Lambris, 2002).

A peroxidase, libertada pelos grânulos citoplásmicos dos fagócitos, participa na resposta oxidativa contra os patógenos. Sabe-se que os níveis de peroxidase no plasma aumentam como resposta a uma infeção (Alvarez-Pellitero, 2008). Então, as peroxidases libertadas no sangue são frequentemente utilizadas como um indicador do estado imunológico ativo dos leucócitos circulantes. Lisozima é uma enzima muito útil contra patógenos, especialmente bactérias Gram-positivas, por estas possuírem uma camada externa de peptidoglicano (Yano, 1996). Com a origem dos leucócitos, a lisozima é amplamente distribuída nos bacteriófagos, micróbios, invertebrados e vertebrados e é encontrada numa grande variedade de secreções como o muco, tecido linfático e soro (Saurabh e Sahoo, 2008). A tripsina é uma protease extracelular digestiva, sintetizada nas células granulares do tecido pancreático, não possuindo um substrato natural no corpo do peixe, a sua presença no plasma do sangue sendo um risco para as proteínas aí contidas (Braun *et al.*, 1990). A atividade inibitória da tripsina representa a capacidade do peixe de contrariar os mecanismos ativados pelos patógenos para evadir o seu sistema imune (Henry *et al.*, 2018).

A pesquisa de enzimas antioxidantes no fígado pode fornecer uma boa avaliação do estado antioxidante de um indivíduo. O *stress* oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre os níveis de produção de espécies de oxigénio reativas (ROS) e de antioxidantes (Biller e Takahashi, 2018; Blier, 2014; Costa-Silva *et al.*, 2015). As ROS produzidas, e os resultantes radicais livres, são o resultado de mecanismos de metabolismo celular comuns, uma elevada gama destes compostos sendo considerada elementos-chave em várias vias metabólicas e na defesa dos organismos. Os subprodutos destas reações podem ser potentes bactericidas, que participam ativamente na destruição de patógenos invasores (Biller e Takahashi, 2018). A ocorrência de *stress* oxidativo, foi correlacionada com uma suscetibilidade a diferentes fatores *stress*antes bióticos ou abióticos e ao desenvolvimento de diversas patologias (Blier, 2014). Os organismos aquáticos desenvolveram um sistema de modo a prevenir ou reparar os efeitos do *stress* oxidativo, podendo ser através de antioxidantes de origem enzimática,

tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), ou a glutathione peroxidase (GPX), ou através de moléculas não enzimáticas, tais como o ácido ascórbico e a glutathione (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017). Quando as espécies ROS não são neutralizadas, estas podem reagir com os lípidos das membranas celulares (Ahmad *et al.*, 2000), induzindo a peroxidação lipídica, considerada uma das principais consequências do stress oxidativo (Hermes Lima, 2004; Modesto e Martinez, 2010).

Os ensaios em *time course* têm como objetivo o estudo da resposta, a curto prazo do hospedeiro, à infeção com o patógeno. Para tal, são feitas amostragens, durante um período, separadas por curtos intervalos de tempo após a infeção, de modo a estudar vários parâmetros de resposta imune e stress oxidativo.

Este estudo está englobado no projeto BE4AQUAHEALTH – Rastreo nacional de patologias de peixes de aquacultura: uma aposta na prevenção (MAR-02.05.01-FEAMP-0013). Este projeto visa estudar os principais patógenos (bactérias, vírus e parasitas) ao longo do ciclo de vida de espécies cultivadas em Portugal e a sua prevalência. Os objetivos são o estudo de marcadores hematológicos e imunológicos e a compreensão das interações entre organismo hospedeiro e patógeno nas espécies mais produzidas em aquaculturas portuguesas em relação aos principais patógenos que as afetam.

Esta dissertação tem como objetivos o estudo das interações entre hospedeiro-patógeno em douradas em diferentes fases do seu ciclo de vida infetadas com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e em robalo infetado com *Vibrio anguillarum* através de ensaios de infeção em *time course*.

2. Materiais e métodos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de contenção do Edifício Cetemares (Peniche, Portugal), sob a supervisão de um perito acreditado em Ciências de Animais de Laboratório pela DGAV (segundo as recomendações da FELASA para a categoria C), de acordo com a legislação para a proteção dos animais utilizados para fins científicos (Diretiva 2010/63/EU) e sob a licença de autorização do projeto 023876/2019.

A preparação das bactérias utilizadas nas infeções em *time course*, *Phdp* e *V. anguillarum*, foi feita de acordo com o mesmo protocolo. A bactéria foi descongelada à temperatura ambiente, e cultivada em 30 mL de meio *Trypticase soy broth* (TSB, suplementado com 1% NaCl). Após 48 horas de incubação da bactéria em meio líquido (Orbital incubator SI500, Stuart, UK), fez-se uma centrifugação durante 30 minutos, a 1140 x g (a 4°C) (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburgo). Em seguida, foi retirado o sobrenadante e a bactéria foi ressuspensa em *Phosphate-buffered saline* (PBS, a 1x). Foi obtida a concentração desejada, através da leitura da absorvância da amostra a 600 nm num espectrofotómetro (Evolution 201, Thermo Scientific, EUA) até ao intervalo de 0,80-0,83, obtendo-se uma concentração de 10^8 UFCmL⁻¹. Para a verificação da concentração, foram efetuadas diluições decimais sucessivas da concentração bacteriana inicial de 1:10 em PBS (1x), sendo plaqueados, em duplicado, 100 µL em meio *Trypticase soy agar* (TSA, suplementado com 1% NaCl). As placas foram incubadas durante 48 horas, em estufa a 22 °C.

Os peixes foram adquiridos numa aquacultura portuguesa, e colocados em quarentena durante 15 dias, após a sua chegada ao laboratório. O primeiro ensaio, designado por A, consistiu na infeção de juvenis de dourada (21 indivíduos por aquário) com um peso médio de $40 \pm 7,30$ g (média \pm DP), com *Phdp* (AQP17.1 – Santiago de Compostela) com dose de LD₅₀ de 10^5 UFC g⁻¹ (calculada anteriormente), a uma temperatura de $24,32 \pm 10,38$ °C, pH $8,23 \pm 3,51$, salinidade $31,28 \pm 13,35$ e oxigénio dissolvido de $6,14 \pm 2,64$ mg L⁻¹.

O segundo ensaio, designado por B, consistiu na infeção de juvenis de dourada (22 indivíduos por aquário) com um peso médio de $9,8 \pm 2,20$ g (média \pm DP), com *Phdp* (AQP17.1 – Santiago de Compostela) com dose de LD₅₀ de 10^5 UFCg⁻¹ (calculada anteriormente), a uma

temperatura de $25,08 \pm 0,14$ °C, pH $8,04 \pm 0,05$, salinidade $30,95 \pm 0,06$ e oxigénio dissolvido de $6,62 \pm 0,04$ mg L⁻¹.

O terceiro ensaio, designado por C, consistiu na infeção de juvenis de robalo (15 indivíduos por aquário) com um peso médio de $25,5 \pm 8,18$ g (média \pm DP), com *V. anguillarum* (AQV 55.1 – Santiago de Compostela) com dose de LD₅₀ 10^6 UFCg⁻¹ (calculada anteriormente), a uma temperatura de $24,53 \pm 0,17$ °C, salinidade $32,06 \pm 0,53$ e oxigénio dissolvido de $6,69 \pm 0,50$ mg L⁻¹.

Individualmente, os indivíduos foram transportados do seu tanque inicial para uma tina com 2-fenoxietanol ($0,5$ mL L⁻¹), com arejamento e, depois de anestesiados, procedeu-se à infeção. Os indivíduos dos tanques de controlo foram injetados intraperitonealmente com 100 µL PBS (1x) e os dos tanques de infeção foram injetados com 100 µL do patógeno correspondente, em cada um dos ensaios.

O sistema experimental de cada ensaio em *time course* era composto por seis tanques, três tanques com indivíduos de controlo e três tanques com indivíduos infetados. Os tanques atribuídos a cada tratamento foram distribuídos aleatoriamente. Cada tanque possuía um sistema de recirculação de água individual, composto por um filtro mecânico (lã de vidro), filtro biológico (biobolas), filtro UV. Os indivíduos foram alimentados diariamente até à saciedade. Foi registada a mortalidade e observado o comportamento dos indivíduos. Foram efetuadas rotinas diárias de limpeza (sifonagem dos tanques, limpeza das lãs de vidro), medições dos parâmetros da qualidade da água e efetuadas trocas de água dos sistemas individuais. Semanalmente foram medidos os parâmetros amónia e nitritos. Todos os valores de medição dos parâmetros foram registados.

Foram amostrados, para cada ensaio, dois indivíduos de cada aquário aos tempos 0h (antes da infeção), 3h, 6h, 9h, 24h e 48h após a infeção. Os indivíduos foram anestesiados com 2-fenoxietanol a $0,5$ mL L⁻¹ e pesados individualmente. Em seguida, foi recolhido sangue da veia caudal com uma seringa heparinizada (3000 unidades mL⁻¹) para a análise dos parâmetros hematológicos. Foram eutanasiados os peixes através de uma sobredosagem de anestésico, e procedeu-se à recolha do fígado para análise de parâmetros de *stress* oxidativo. As amostras foram imediatamente armazenadas em azoto líquido e, posteriormente,

colocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização. No ensaio C, além das outras amostragens, foi realizada uma amostragem final, 10 dias após a infeção.

3. Parâmetros analíticos

3.1. Parâmetros hematológicos

Os parâmetros analisados consistiram na determinação do hematócrito, determinação da hemoglobina, na contagem diferencial de células sanguíneas, contagem de eritrócitos e leucócitos. O sangue recolhido foi colocado num microtubo com $20\text{ }\mu\text{L}$ de heparina a $3000\text{ unidades mL}^{-1}$. Para a determinação do hematócrito, foram utilizados tubos microhemáticos heparinizados. Foram cheios, por capilaridade, até à marca do tubo, uma das extremidades foi selada com plasticina, e os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a $10\text{ }000\text{ rpm}$. Em seguida, os resultados foram lidos através de um leitor de gráfico e os resultados foram registados.

Para a avaliação da concentração de eritrócitos e leucócitos presentes no sangue foram realizadas diluições das amostras de sangue de 1:200 e 1:20, respetivamente, em PBS (1x) com heparina a $30\text{ unidades mL}^{-1}$. Foi preenchida a câmara de Neubauer com a amostra e foram efetuadas as contagens em 5 quadrados. Foram realizados esfregaços para a contagem diferencial de células (trombócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos). As amostras foram secas ao ar e foram fixadas com uma solução de formol e etanol a 1:10 (90% etanol absoluto para 10% de formaldeído a 37%) durante 1 minuto (Kaplow, 1965). Os neutrófilos foram identificados através da deteção da atividade da peroxidase, pelo método utilizado por Afonso *et al.* (1998). Em seguida, as lâminas foram coradas com a coloração de Wright's (Haemacolor, Merck) e observadas ao microscópio ($1000\times$). As células imunes foram identificadas e as contagens diferenciais de neutrófilos, monócitos, linfócitos e trombócitos foram feitas num número total de 200 células por esfregaço.

Para a determinação da concentração de hemoglobina, a amostra de sangue ($1\text{ }\mu\text{L}$) foi colocada em $500\text{ }\mu\text{L}$ de reagente Drabkin (SpinReact, Espanha), mantendo-se no escuro até à colocação na microplaca. Foram colocados $100\text{ }\mu\text{L}$ da amostra, em triplicado, numa microplaca e foi lida a absorvância a 540 nm (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA). Para os cálculos da hemoglobina, foi subtraída a média do branco à média das absorvâncias, tendo

os restantes cálculos sido feitos de acordo com as instruções do fornecedor. Os resultados foram apresentados em g dL⁻¹. O volume corpuscular médio (MCV), a hemoglobina corpuscular média (MCH) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (MCHC) foram calculados de acordo com as equações na Figura 3.

a)
$$MCV (\mu m^3) = \frac{Hematócrito (\%)}{Eritrócitos (\times 10^4 \mu^{-1})} \times 10$$

b)
$$MCH (pg \text{ célula}^{-1}) = \frac{Hemoglobina (g \text{ dL}^{-1})}{Eritrócitos (\times 10^4 \mu^{-1})} \times 10$$

c)
$$MCHC (g \text{ 100 mL}^{-1}) = \frac{Hemoglobina (g \text{ dL}^{-1})}{Hematócrito (\%)} \times 100$$

Figura 3: Equações para o cálculo do: a) MCV (μm^3), b) MCH (pg célula⁻¹) e c) MCHC (g 100 mL⁻¹)

Os microtubos com as amostras de sangue foram centrifugados a 10 000 × g durante 10 minutos (4 °C), recolhendo-se o sobrenadante, o plasma, para um microtubo limpo, sendo este utilizado para a análise dos parâmetros de resposta imune. As amostras de plasma foram armazenadas a -80 °C até à realização das diferentes determinações.

3.2. Parâmetros de resposta imune

Para a análise da atividade da peroxidase no plasma, foi utilizado o método descrito por Quade & Roth (1997). Foram utilizados 15 μL de plasma de cada amostra, em triplicado e 135 μL de PBS (1x) numa microplaca de 96 poços. A estes, adicionaram-se 50 μL de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride hidrate, sem Ca^{2+} ou Mg^{2+} (TMB; Sigma-Aldrich, EUA), a 10 mM e 50 μL de peróxido de hidrogénio (H_2O_2 , 5 mM) a cada poço, após dois minutos, parou-se a reação com ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 2 M). Foi medida a absorvância a um comprimento de onda de 450 nm num espectrofotómetro (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA).

Para a análise da tripsina inibida no plasma e das proteases, foi utilizado o método descrito inicialmente por Ellis (1990), com alterações realizadas por Machado *et al.* (2015). Todas as análises foram realizadas em duplicado. Foram utilizados 10 μL de plasma e 10 μL

de solução de tripsina (em NaHCO_3 , 5 mg mL^{-1}), e a mistura foi incubada durante 10 minutos a 22°C . Foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de PBS ($13,9 \text{ mg mL}^{-1}$, NaH_2PO_4 , pH 7,0) e $125 \mu\text{L}$ de azocaseína (em NaHCO_3 , 20 mg mL^{-1}). A mistura foi incubada a 22°C , durante 1 hora. Após a incubação, foram adicionados $250 \mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA, 100 mg mL^{-1}) frio, e a mistura foi novamente incubada a 22°C , durante 30 minutos. Em seguida, foi centrifugada a $10\,000 \times g$, durante 5 minutos (SIGMA 4-16 PK). Foram transferidos $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante para uma microplaca de 96 poços, juntamente com $100 \mu\text{L}$ de NaOH (40 mg mL^{-1}), e foi lida a absorvância a 450 nm num espectrofotômetro (Synergy HT, Biotek). Na realização dos brancos, a amostra foi substituída por PBS.

3.3. Parâmetros de *stress* oxidativo

Para a análise dos parâmetros de *stress* oxidativo, foi necessária a homogeneização do fígado sendo depois pesada uma quantidade de cerca de $0,1 \text{ g}$ e homogeneizada em $1000 \mu\text{L}$ de água ultrapura (MiliQ), utilizando um homogeneizador portátil (Pellet Mixer, VWR, EUA). Em seguida, foram retirados $200 \mu\text{L}$ do homogeneizado para um microtubo de 2 mL com $4 \mu\text{L}$ de 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) a 4% em metanol para a análise da peroxidação lipídica (LPO), adicionou-se $800 \mu\text{L}$ de tampão Fosfato de potássio $0,2\text{M}$ (pH 7,4) e centrifugou-se durante 20 minutos a $10\,000 \times g$ (a 4°C) (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburgo). Após a centrifugação, foram retiradas alíquotas de $250 \mu\text{L}$ de sobrenadante para as análises de glutatona total (tGSH) e glutatona S-transferase (GST), alíquotas de $100 \mu\text{L}$ para as análises da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e alíquotas de $50 \mu\text{L}$ de para a medição da proteína.

A medição da proteína das amostras de fígado foi realizada através do kit comercial BCA *Protein Assay Kit* (Pierce™, Thermo Scientific, EUA), em que foram utilizados $10 \mu\text{L}$ de amostra diluída de 1:10, em duplicado, juntamente com $200 \mu\text{L}$ da solução de reação, para uma microplaca de 96 poços. Envolveu-se a placa em parafilme e foi incubada durante 30 minutos a 37°C na estufa. Após a incubação, foi lida a absorvância das amostras a dois comprimentos de onda, 550 nm e 630 nm num espectrofotômetro (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA). Todas as análises seguintes foram realizadas em triplicado.

A determinação da peroxidação lipídica (LPO) foi realizada com base no método descrito por Bird e Draper (1984). Foram adicionados 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) às amostras e aos brancos (200 μL de água MiliQ) e foram agitados num vortex. Foi adicionado 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,73%, Tris-HCl (60 mM) e DTPA (0,1 mM, pH 7,4, ácido dietilenotriaminopentacético), às amostras e brancos, e os microtubos foram incubados durante uma hora a 100 °C. Em seguida, foram centrifugados a 15 000 x *g* durante 5 minutos (temperatura ambiente), foram retirados 200 μL do sobrenadante de cada amostra, em triplicado, para uma microplaca de 96 poços, e foi lida a absorvância das amostras a um comprimento de onda de 535 nm num espectrofotómetro (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA).

A determinação da catalase (CAT) foi realizada com base no método descrito por Clairborne (1985). As amostras foram diluídas no tampão utilizado neste procedimento, de modo a obter um valor de proteína de 0,7 mg mL⁻¹ em 10 μL na microplaca. Foram adicionados 140 μL de tampão fosfato de potássio (K₂HPO₄, 0,05 M, pH 7,0) e 150 μL de tampão de reação (H₂O₂ a 30% e tampão fosfato de potássio a 0,05 M) com uma pipeta multicanal a cada triplicado, sendo, logo de seguida, lida a absorvância a 240 nm durante 2 minutos numa microplaca apropriada para luz UV (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA).

A determinação da superóxido dismutase (SOD) foi realizada com base no método descrito por McCord e Fridovich (1969). As amostras foram diluídas em tampão fosfato de potássio (K₂HPO₄, 0,05 M, pH 7,8) até se obter um valor de proteína de 0,3 mg mL⁻¹. Foram pipetados 100 μL da amostra diluída, 250 μL da solução de reação composta por Xantina a 0,7 mM, Citocromo C a 0,03 mM e tampão fosfato de potássio (0,05 M, pH 7,8, EDTA 0,1 mM) para a microplaca. Foi adicionada, logo de seguida, a Xantina Oxidase a 0,03 U mL⁻¹. Foi lida a absorvância das amostras a um comprimento de onda de 550 nm a cada 20 segundos durante 3 minutos, num espectrofotómetro (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA).

A determinação da Glutathione S-Transferase (GST) foi realizada com base no método descrito por Habig *et al.* (1974). As amostras foram diluídas em tampão fosfato de potássio (K₂HPO₄, 0,2 M, pH 7,4) quando foram colocadas na microplaca de 96 poços, para se obter um valor de proteína de 0,7 mg mL⁻¹. Foram adicionados 250 μL da solução de reação, composta por tampão fosfato de potássio (K₂HPO₄, 0,05 M, pH 6,5), L-Glutathione reduzida (GSH), e CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene). Foi lida a absorvância das amostras a 340 nm,

a cada 20 segundos durante 5 minutos num espectrofotómetro (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA).

A determinação da Glutathiona Total (tGSH) foi realizada com base no método descrito por Baker *et al.* (1990). Foram utilizados 50 µL das amostras diluídas de modo a obter-se um valor de proteína de 0,7 mg mL⁻¹. Para os brancos, a amostra foi substituída por tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 7,4). Foram adicionados 250 µL da solução de reação, composta por tampão fosfato de potássio (K₂HPO₄, 0,2 M, pH 8,0), NADPH (β-Nicotinimide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt, 5mg mL⁻¹), DTNB (5-5'- dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) e Glutathiona redutase (GR, 168 U mg proteína⁻¹). Foi medida a absorvância a 340 nm durante 3 minutos num espectrofotómetro (Epoch™, Biotek® Instruments, Inc., EUA).

4. Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado com recurso ao programa IBM SPSS Statistics 26. Os valores obtidos foram apresentados, sempre que aplicável, no formato de média ± desvio-padrão (DP). Na análise dos valores hematológicos, de resposta imune e de *stress* oxidativo obtidos nos ensaios, foram comparadas as médias dos valores obtidos entre os vários tempos de amostragem (0h, 3h, 6h, 9h, 24h, 48h e tempo final) para cada parâmetro analisado.

A estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) com um fator, seguindo o teste de Tukey. Todos os pressupostos inerentes à realização da ANOVA (neste caso, a normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram validados através do teste de Levene e, caso não tenha sido verificada a homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo comparadas as médias através da comparação de Pairwise. Para ambos os casos, foi utilizado um nível de significância de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Mortalidade

Na figura 4, encontram-se representados os resultados da mortalidade cumulativa dos ensaios A, B e C. Pode observar-se que ocorreu uma mortalidade total mais elevada no ensaio B (37%), correspondendo às douradas de menor peso ($9,8 \pm 2,20$ g) (Figura 4b), comparativamente ao ensaio A (7%) (Figura 4a), douradas maiores ($40 \pm 7,30$ g). No ensaio C, foi verificada uma mortalidade de 87% (Figura 4c). No ensaio A, foi observada mortalidade no dia 5 após a infeção, no ensaio B ocorreu mortalidade a partir do dia 3 após a infeção enquanto no ensaio C, foi observada mortalidade elevada, logo no segundo dia após a infeção.

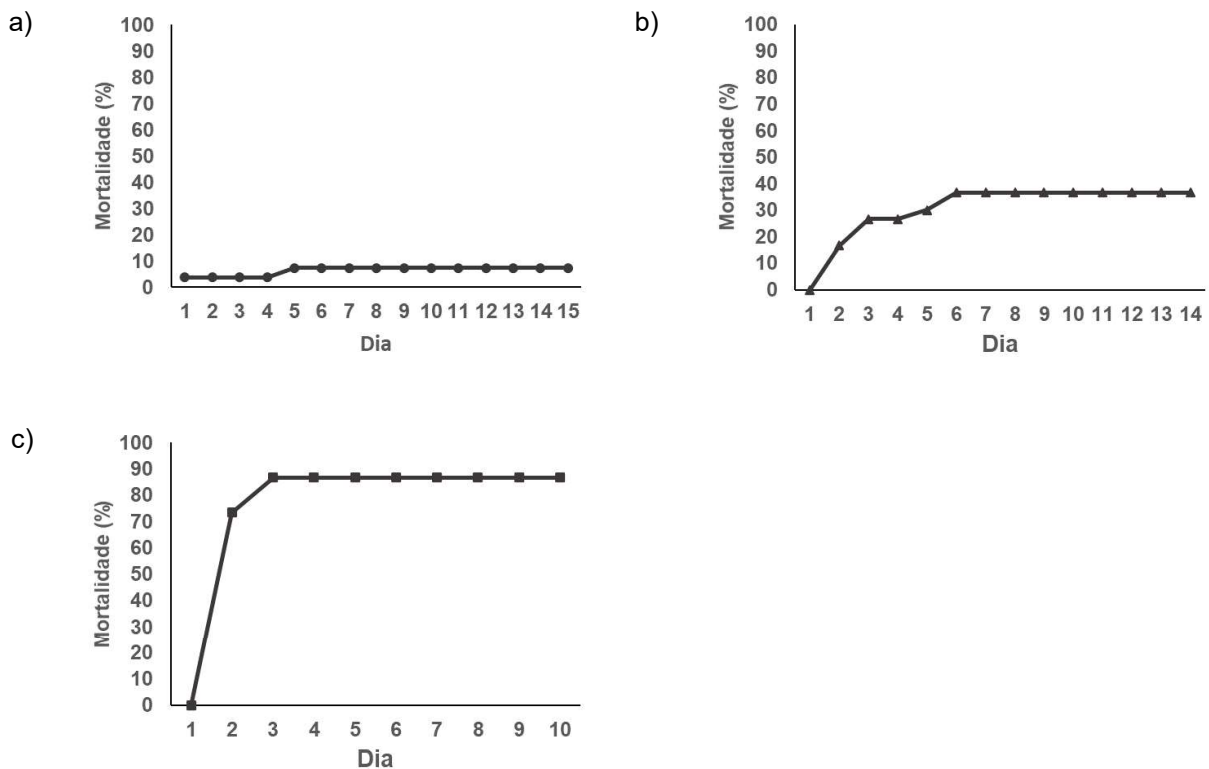


Figura 4: Mortalidade cumulativa dos ensaios: a) infeção de *Sparus aurata* com peso médio de $40 \pm 7,30$ g com *Phdp*, b) infeção de *Sparus aurata* com peso médio de $9,8 \pm 2,20$ g com *Phdp* e c) infeção de *D. labrax* com peso médio de $25,5 \pm 8,18$ g com *V. anguillarum*

5.2. Hematologia

Na tabela 1 estão representados os valores médios e respectivos desvios-padrões dos parâmetros hematológicos avaliados no ensaio A. Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros hematológicos analisados, exceto na quantificação dos linfócitos. Os valores médios de eritrócitos aumentaram significativamente até às 9H, tendo voltado ao valor basal a partir das 24H, após a infeção. No teor de leucócitos, foram observadas diferenças significativas entre as 0H (amostragem antes da infeção, a que correspondeu o menor valor) e todos os outros momentos de amostragem. Observou-se um aumento do número de leucócitos a partir do momento da infeção. Na análise dos trombócitos, observaram-se diferenças significativas entre as 0H e as 6H, e os restantes tempos, sendo estes significativamente mais elevados que o valor inicial e o das 6H, após a infeção. Relativamente aos valores de monócitos, ocorreu um pico do valor médio às 6H. Na análise dos resultados dos neutrófilos, observaram-se diferenças significativas entre o valor das 0H, correspondente ao mínimo, e os valores mais elevados, obtidos às 6H, 9H e 24H, após a infeção. Observou-se um aumento no número de neutrófilos desde a infeção até às 24H.

A média, dos valores obtidos para o hematócrito, aumentou significativamente a partir o momento inicial até às 9H, voltando ao valor inicial a partir das 24H. Nos teores de hemoglobina, observou-se uma diminuição do seu valor às 3H, tendo depois voltado ao valor inicial nas amostragens entre as 3H e as 9H. Observam-se diferenças estatisticamente significativas, quando comparados os valores obtidos às 6H e 9H com os das 24H e 48H. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as 9H e as 24H na análise do MCV, correspondendo ao valor mínimo e máximo, respetivamente. Na análise do MCH, houve diferenças entre as 0H e as 24H, tendo sido observado um decréscimo significativo do valor médio às 24H, comparativamente ao valor obtido às 0H. Relativamente aos valores médios de MCHC, houve diferenças entre as 0H e 6H, os valores mais elevados, e as 24H, o valor mínimo registado.

Tabela 1: Valores (média ± desvio-padrão) de: leucócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), eritrócitos* ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), hematócrito (%), hemoglobina (g dL^{-1}), MCV (μm^3), MCH (pg cel^{-1}), MCHC (g 100mL^{-1}), neutrófilos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), monócitos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) e trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), do ensaio A com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de $40 \pm 7,30$ g ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

	0H	3H	6H	9H	24H	48H
Eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	1,67 ± 0,35 ^A	2,15 ± 0,23 ^{AB}	3,07 ± 1,23 ^B	3,22 ± 0,66 ^B	1,78 ± 0,61 ^A	1,92 ± 0,89 ^{AB}
Leucócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	4,04 ± 1,50 ^A	8,20 ± 1,62 ^B	8,08 ± 1,13 ^B	8,50 ± 2,36 ^B	8,27 ± 1,74 ^B	8,45 ± 1,77 ^B
Trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	1,51 ± 0,55 ^A	4,38 ± 1,21 ^B	2,70 ± 0,82 ^A	3,64 ± 1,00 ^B	3,70 ± 1,10 ^B	4,41 ± 0,81 ^B
Linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	2,27 ± 0,92	2,30 ± 0,34	3,40 ± 0,66	2,35 ± 0,61	3,03 ± 1,04	3,13 ± 0,71
Monócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	0,12 ± 0,08 ^A	0,25 ± 0,14 ^{AB}	0,55 ± 0,12 ^B	0,38 ± 0,19 ^{AB}	0,29 ± 0,22 ^{AB}	0,38 ± 0,12 ^{AB}
Neutrófilos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	0,15 ± 0,10 ^A	1,02 ± 0,51 ^{AB}	1,57 ± 0,37 ^B	1,72 ± 0,48 ^B	1,11 ± 0,26 ^B	0,38 ± 0,15 ^{AB}
Hematócrito (%)	29,75 ± 5,74 ^A	38,00 ± 3,16 ^B	39,33 ± 4,41 ^B	40,33 ± 5,43 ^B	30,83 ± 2,32 ^A	34,00 ± 7,92 ^{AB}
Hemoglobina (g dL^{-1})	1,11 ± 0,36 ^B	0,93 ± 0,27 ^A	1,49 ± 0,20 ^B	1,23 ± 0,19 ^B	0,57 ± 0,15 ^A	0,89 ± 0,27 ^A
MCV (μm^3)	173,60 ± 15,44 ^{AB}	171,23 ± 33,80 ^{AB}	159,56 ± 49,77 ^{AB}	129,33 ± 25,32 ^A	206,60 ± 50,48 ^B	155,78 ± 24,27 ^{AB}
MCH (pg células^{-1})	5,47 ± 1,78 ^B	4,70 ± 1,00 ^{AB}	5,20 ± 1,56 ^{AB}	3,78 ± 0,25 ^{AB}	2,83 ± 0,61 ^A	4,38 ± 0,98 ^{AB}
MCHC (g 100mL^{-1})	3,27 ± 1,06 ^B	2,64 ± 0,59 ^{AB}	3,48 ± 1,01 ^B	3,22 ± 0,58 ^{AB}	1,86 ± 0,60 ^A	2,74 ± 0,21 ^{AB}

Na análise dos parâmetros hematológicos do ensaio B, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise de todos os parâmetros, exceto nos valores e MCV e de MCH (Tabela 2). O valor médio dos eritrócitos diminuiu após a infecção sendo significativamente diferente às 9H e às 24H após a infecção, comparativamente ao valor máximo obtido às 0H.

Foram observadas diferenças significativas, na análise dos leucócitos, entre os valores maiores de leucócitos às 0H e 48H, e os valores mais baixos das 6H e 9H após a infecção. Observou-se uma tendência de diminuição do teor até às 9H tendo depois voltado a aumentar. Na análise dos valores médios dos trombócitos, foi observado uma diminuição estatisticamente significativa entre a amostragem inicial, e as 3H, 6H e 9H, a média tendo aumentado entre as 3H e 9H após a infecção. Foi observada uma diminuição estatisticamente significativa dos valores médios dos linfócitos entre a amostragem inicial, e as 6H e 9H. Na análise dos valores de monócitos, observou-se um aumento estatisticamente significativo destes entre as 9H após a infecção, e as amostragens seguintes das 24H e 48H. O valor médio de neutrófilos demonstrou picos estatisticamente significativos às 6H e 24H após a infecção, quando comparados com o valor mínimo obtido na amostragem inicial, enquanto que os restantes valores não demonstraram diferenças do valor basal.

Ocorreu uma diminuição significativa da média do hematócrito entre a amostragem inicial e as 48H, os restantes valores não apresentaram diferenças significativas. Na análise da hemoglobina, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre todos os tempos de amostragem, as diferenças sendo mais acentuadas entre os valores mais elevados obtidos às 3H, 6H e 9H, e o valor mais baixo, às 48H. Na análise da média do MCH, observou-se um aumento estatisticamente significativo às 3H, 9H e 24H, comparativamente às amostragens das 48H e inicial.

Tabela 2: Valores (média ± desvio-padrão) de: leucócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), eritrócitos* ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), hematócrito (%), hemoglobina (g dL^{-1}), MCV (μm^3), MCH (pg cel^{-1}), MCHC (g 100mL^{-1}), neutrófilos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), monócitos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) e trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) do ensaio B com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de $9,8 \pm 2,20$ g ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

	0H	3H	6H	9H	24H	48H
Eritrócitos ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	1,85 ± 0,41 ^B	1,58 ± 0,44 ^{AB}	1,44 ± 0,38 ^{AB}	1,18 ± 0,24 ^A	1,54 ± 0,16 ^{AB}	1,25 ± 0,14 ^A
Leucócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	5,44 ± 0,85 ^B	4,26 ± 0,59 ^{AB}	3,62 ± 0,41 ^A	3,14 ± 0,53 ^A	4,68 ± 1,22 ^{AB}	5,52 ± 0,97 ^B
Trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	3,40 ± 0,74 ^B	1,24 ± 0,62 ^A	1,59 ± 0,30 ^A	1,77 ± 0,91 ^A	2,45 ± 0,51 ^{AB}	2,58 ± 0,61 ^{AB}
Linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	1,61 ± 0,46 ^B	0,82 ± 0,21 ^{AB}	0,50 ± 0,15 ^A	0,61 ± 0,22 ^A	1,00 ± 0,26 ^{AB}	0,81 ± 0,18 ^{AB}
Monócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	0,28 ± 0,10 ^{AB}	0,37 ± 0,25 ^{AB}	0,20 ± 0,09 ^{AB}	0,10 ± 0,03 ^A	0,45 ± 0,21 ^B	0,65 ± 0,40 ^B
Neutrófilos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	0,28 ± 0,16 ^A	1,18 ± 0,50 ^{AB}	1,48 ± 0,06 ^B	0,99 ± 0,20 ^{AB}	1,98 ± 0,71 ^B	0,95 ± 0,24 ^{AB}
Hematócrito (%)	26,80 ± 4,85 ^B	27,60 ± 1,52 ^{AB}	27,25 ± 4,99 ^{AB}	22,80 ± 2,68 ^{AB}	22,00 ± 5,48 ^{AB}	19,00 ± 2,71 ^A
Hemoglobina (g dL^{-1})	0,68 ± 0,17 ^C	0,91 ± 0,05 ^B	0,90 ± 0,13 ^{AB}	0,62 ± 0,16 ^{AC}	0,81 ± 0,13 ^{AB}	0,40 ± 0,05 ^A
MCV (μm^3)	138,99 ± 25,25	169,22 ± 17,72	166,24 ± 19,93	178,21 ± 30,49	150,98 ± 8,59	151,84 ± 7,39
MCH (pg célula^{-1})	3,71 ± 1,23 ^B	6,19 ± 1,03 ^A	2,15 ± 1,21 ^A	5,39 ± 0,74 ^A	5,32 ± 0,72 ^A	2,85 ± 0,74 ^B
MCHC (g 100mL^{-1})	2,78 ± 0,88	3,44 ± 0,22	3,48 ± 0,55	2,36 ± 0,82	2,97 ± 0,76	2,23 ± 0,49

Nos parâmetros hematológicos dos ensaios A (Tabela 1) e B (Tabela 2), pode observar-se que os valores médios destes diferem entre ensaios. Apesar dos valores médios de eritrócitos terem sido semelhantes, no ensaio A os valores aumentaram às 9H após a infecção, e no ensaio B diminuíram à mesma hora. Os valores médios de leucócitos dos indivíduos do ensaio A são significativamente mais elevados que os do ensaio B, à exceção do valor da amostragem inicial, e aumentando com os tempos de amostragem, enquanto no ensaio B, ocorreu a diminuição da média a certos tempos.

Os valores médios de trombócitos foram mais elevados no ensaio A que no ensaio B. Nos linfócitos, apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas no ensaio B. Na análise dos monócitos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre diferentes tempos de amostragem nos ensaios A e B, no ensaio A tendo sido em tempos iniciais (0H e 6H), e no ensaio B nos tempos finais (9H, 24H e 48H). Relativamente aos valores médios de neutrófilos, foi observado um pico às 9H no ensaio A, e às 24H no ensaio B.

Na análise do hematócrito, no ensaio A foi observado um aumento da média ao longo dos tempos iniciais de amostragem, mas no ensaio B foi observada uma diminuição significativa do valor médio apenas às 48H após a infecção. Estes valores também foram significativamente menores no ensaio B do que no ensaio A. Os valores médios de hemoglobina obtidos no ensaio A diminuem às 3H e 24H e, por outro lado, os valores médios no ensaio B aumentam às 3H, tendo sido mais elevados no ensaio A. No caso do MCV e MCHC, só foram observadas diferenças estatisticamente significativas no ensaio A. Nos valores obtidos no ensaio A, a média do MCH diminui entre o tempo inicial de amostragem e as 24H, e no ensaio B aumenta no mesmo intervalo de tempo.

Na tabela 3 estão representados os valores médios e respetivos desvios-padrões dos parâmetros hematológicos avaliados no ensaio C. Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros hematológicos analisados. Observou-se valores significativamente mais elevados de eritrócitos aos tempos inicial e final. Na análise dos valores médios dos leucócitos, observou-se um valor significativamente mais elevado na amostragem final (10 dias), comparativamente às amostragens aos tempos 6H, 9H, 24H e 48H.

O valor médio de trombócitos diminuiu significativamente entre a amostragem inicial e 3H, e as 6H e 9H após a infecção. Na análise dos linfócitos, foi observado um pico do valor médio na amostragem final. Ocorreu um aumento significativo do valor médio de monócitos às 48H e tempo final, comparativamente ao valor inicial. Foi observada um aumento da média dos neutrófilos aos tempos 6H, 9H e final, enquanto que os restantes valores não diferiram do inicial.

O valor médio do hematócrito diminuiu significativamente entre o tempo inicial e as 3H, voltando a valores basais nas restantes amostragens. Ocorreu um pico do valor médio da hemoglobina na amostragem final. Os valores de MCV máximo e mínimo foram observados às 9H após a infecção e tempo final, respetivamente. Na análise do MCH e do MCHC, foi observado um pico nas médias na amostragem final.

Tabela 3: Valores (média ± desvio-padrão) de: leucócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), eritrócitos* ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), hematócrito (%), hemoglobina (g dL^{-1}), MCV (μm^3), MCH (pg cel^{-1}), MCHC (g 100mL^{-1}), neutrófilos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), monócitos* ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$), linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) e trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$) do ensaio C com robalos (*Dicentrarchus labrax*) com peso médio de 25,5 ± 8,18 g (n = 6). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

	0H	3H	6H	9H	24H	48H	Final
<i>Eritrócitos</i> ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	2,82 ± 0,83 ^B	1,96 ± 0,26 ^A	2,05 ± 0,16 ^A	1,72 ± 0,20 ^A	2,15 ± 0,54 ^A	2,06 ± 0,24 ^A	3,55 ± 0,27 ^B
<i>Leucócitos</i> ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	3,77 ± 1,19 ^{AB}	3,72 ± 0,95 ^{AB}	2,50 ± 1,02 ^A	3,05 ± 0,60 ^A	2,67 ± 0,99 ^A	2,55 ± 0,85 ^A	5,35 ± 1,76 ^B
<i>Trombócitos</i> ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	2,69 ± 0,84 ^B	2,91 ± 0,80 ^B	1,31 ± 0,38 ^A	1,38 ± 0,63 ^A	1,66 ± 0,68 ^{AB}	1,48 ± 0,41 ^{AB}	2,43 ± 0,89 ^{AB}
<i>Linfócitos</i> ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	0,81 ± 0,27 ^B	0,52 ± 0,18 ^{AB}	0,36 ± 0,20 ^A	0,43 ± 0,18 ^A	0,46 ± 0,22 ^{AB}	0,39 ± 0,20 ^{AB}	1,25 ± 0,39 ^C
<i>Monócitos</i> ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	0,06 ± 0,03 ^A	0,06 ± 0,01 ^{AB}	0,11 ± 0,08 ^{AB}	0,14 ± 0,03 ^{AB}	0,06 ± 0,02 ^{AB}	0,23 ± 0,08 ^B	0,23 ± 0,10 ^B
<i>Neutrófilos</i> ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	0,09 ± 0,05 ^A	0,19 ± 0,03 ^{AB}	0,88 ± 0,50 ^B	0,91 ± 0,24 ^B	0,43 ± 0,15 ^{AB}	0,45 ± 0,19 ^{AB}	1,45 ± 0,49 ^B
<i>Hematócrito</i> (%)	39,50 ± 7,13 ^B	25,33 ± 0,58 ^A	28,75 ± 2,87 ^{AB}	35,25 ± 3,20 ^{AB}	30,00 ± 5,10 ^{AB}	30,67 ± 3,21 ^{AB}	37,00 ± 3,46 ^{AB}
<i>Hemoglobina</i> (g dL^{-1})	1,33 ± 0,34 ^{AB}	1,16 ± 0,23 ^A	1,34 ± 0,22 ^{AB}	1,15 ± 0,24 ^A	1,37 ± 0,33 ^{AB}	1,43 ± 0,17 ^{AB}	4,00 ± 1,10 ^B
<i>MCV</i> (μm^3)	135,96 ± 30,46 ^C	134,33 ± 27,64 ^{ABC}	139,65 ± 5,67 ^{ABC}	199,91 ± 29,92 ^B	155,40 ± 27,73 ^{AB}	142,60 ± 5,34 ^{ABC}	75,38 ± 50,76 ^A
<i>MCH</i> (pg célula^{-1})	4,89 ± 1,30 ^A	6,11 ± 1,21 ^A	6,53 ± 0,86 ^A	6,65 ± 0,74 ^A	6,67 ± 2,10 ^A	7,05 ± 1,51 ^A	11,20 ± 2,52 ^B
<i>MCHC</i> (g 100mL^{-1})	3,49 ± 0,92 ^A	4,78 ± 0,79 ^{AB}	4,49 ± 0,57 ^{AB}	3,38 ± 0,72 ^{AB}	4,73 ± 1,50 ^{AB}	4,46 ± 0,44 ^{AB}	11,96 ± 3,35 ^B

5.3. Resposta imune

Na análise dos parâmetros de resposta imune dos indivíduos do ensaio A, foi observada uma diminuição significativa dos valores médios da atividade da peroxidase e da tripsina inibida às 3H, e um aumento significativo 48H, após a infecção (Figura 5a e 5b).

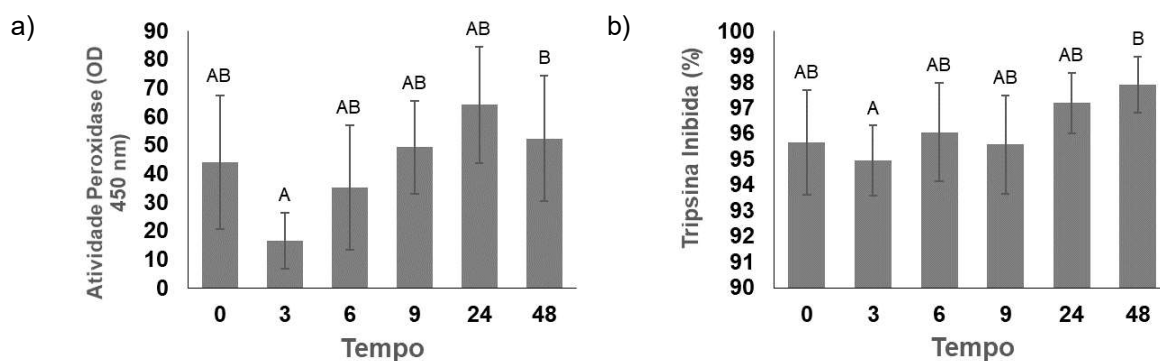


Figura 5: Valores (média \pm desvio-padrão) da: a) atividade da peroxidase * (OD 450 nm), e b) tripsina inibida (%) dos indivíduos do ensaio A ($n = 6$), com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de $40 \pm 7,30$ g. As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

Na figura 6 estão representados os valores médios e respetivos desvios-padrões da atividade da peroxidase (OD 450 nm) (Figura 6a) e da tripsina inibida (%) (Figura 6b) dos indivíduos do ensaio B. Apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas apenas da determinação da tripsina inibida, em que ocorreu um aumento significativo da média desde as 0H até às 48H após a infecção.

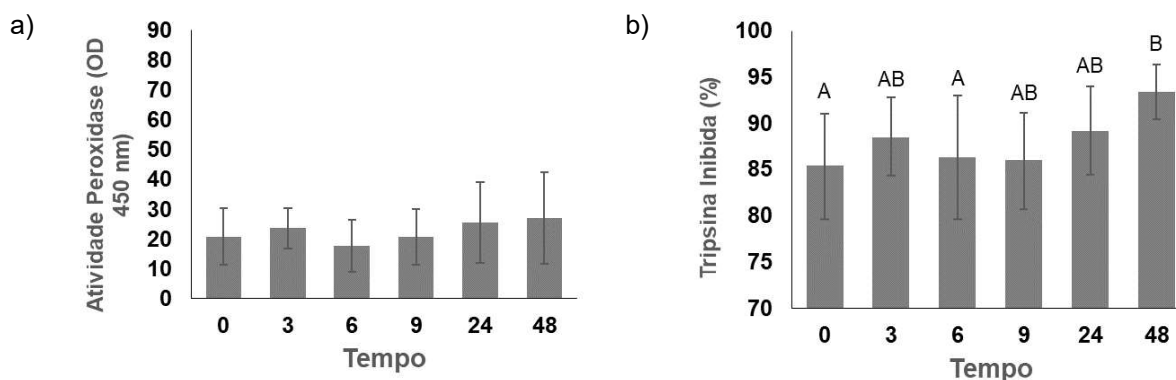


Figura 6: Valores (média \pm desvio-padrão): a) da atividade da peroxidase (OD 450 nm) e b) da tripsina inibida dos indivíduos do ensaio B com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de $9,8 \pm 2,20$ g ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey. Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

Comparando os resultados obtidos nos parâmetros de resposta imune do ensaio A (Figura 5) e do ensaio B (Figura 6), na atividade da peroxidase apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas no ensaio A, apesar de se observar uma elevada diferença entre os valores dos dois ensaios, tendo sido significativamente mais elevados no ensaio A. Na análise da tripsina inibida, foram observados valores máximos às 48H em ambos os ensaios.

Na figura 7 estão representados os valores médios e respetivos desvios-padrões da atividade da peroxidase (OD 450 nm) (Figura 7a), da tripsina inibida (%) (Figura 7b) e proteases (Figura 7c) dos indivíduos do ensaio C. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise da atividade da peroxidase e da tripsina inibida. Ocorreu uma diminuição do valor médio da atividade da peroxidase entre o tempo inicial e o final, e foi observado um aumento significativo do valor médio da tripsina inibida entre as duas amostragens iniciais, e as duas amostragens finais.

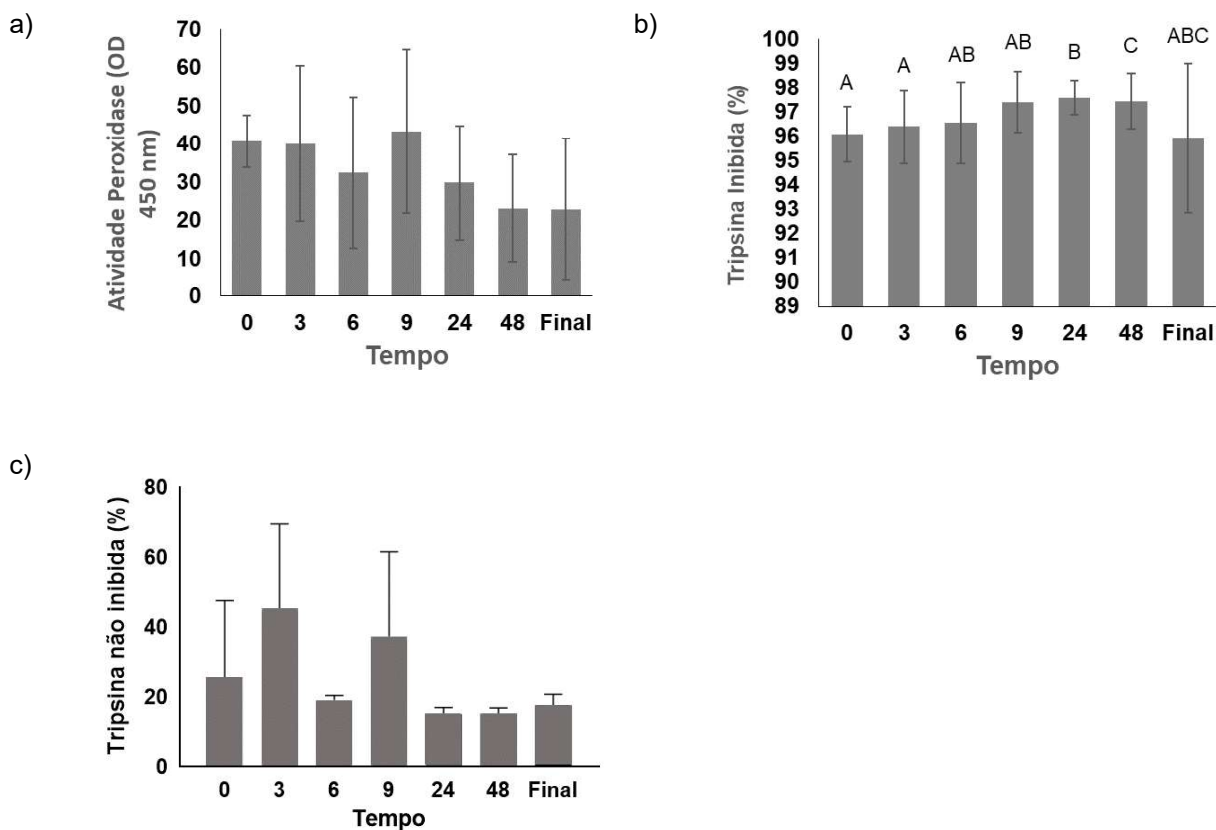


Figura 7: Valores (média ± desvio-padrão): a) da atividade da peroxidase (OD 450 nm), b) da tripsina inibida* (%), e c) das proteases (% tripsina não inibida) do ensaio C com robalos (*Dicentrarchus labrax*) com peso médio de $25,5 \pm 8,18$ g ($n = 6$). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

5.4. Stress oxidativo

Na figura 8 encontra-se a representação gráfica da atividade da catalase do ensaio A. foi observado um pico do valor médio às 9H após a infecção. Não foi possível a realização da análise do LPO, tGSH, GST e SOD para ensaio A devido à falta de amostra biológica.

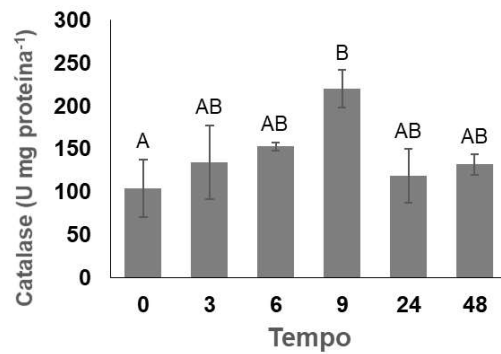


Figura 8: Atividade da catalase (média \pm desvio-padrão), expressa em U mg proteína⁻¹, obtida através de amostras do ensaio A com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de $40 \pm 7,30$ g (n = 6). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey. Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

Na figura 9, estão as representações gráficas da atividade da SOD (Figura 9a), da atividade da catalase (Figura 9b), da peroxidação lipídica (LPO) (Figura 9c), da atividade da GST (Figura 9d) e da atividade da tGSH (Figura 9e) do ensaio B. Na análise da atividade da SOD, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tempos de amostragem. Ocorreu um pico significativo da média da atividade da catalase do às 24H e 48H, e um valor significativamente mais elevado das médias no ensaio A. Na peroxidação lipídica, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Na análise da atividade da GST do ensaio B, foi observado um aumento significativo do valor médio às 6H após a infecção. A análise da atividade da tGSH revelou uma diminuição significativa da média na amostragem das 24H e o valor mais elevado observado às 3H.

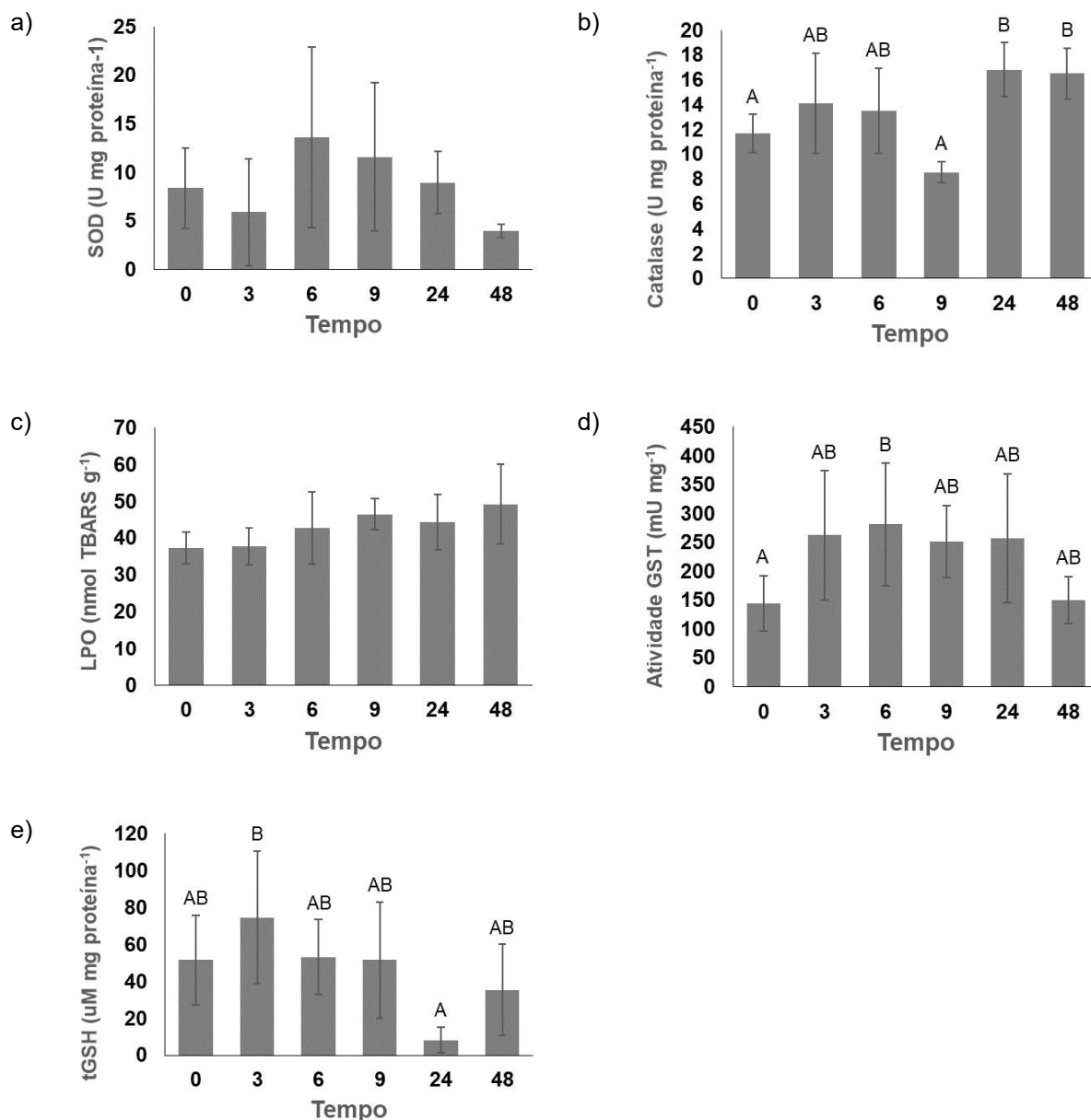


Figura 9: Valores (média \pm desvio padrão) da: a) atividade da SOD, expressa em U mg proteína⁻¹; b) atividade da catalase, expressa em U mg proteína⁻¹; c) peroxidação lipídica (LPO)*, expresso em nmol TBARS g⁻¹; d) atividade da GST, expressa em mU mg⁻¹; e e) atividade da tGSH, expressa em μ M mg proteína⁻¹ do ensaio B com douradas (*Sparus aurata*) com peso médio de $9,8 \pm 2,20$ g (n = 6). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não paramétricos (*, Método Pairwise). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

Na figura 10 estão representadas a atividade da SOD (Figura 10a), atividade da catalase (Figura 10b), peroxidação lipídica (Figura 10c), atividade da GST (Figura 10d) e atividade da tGSH (Figura 10e) do ensaio C. Na análise da atividade da SOD, foram observados valores máximos aos tempos 6H e 24H após a infecção e às 9H foi observado o

valor mínimo. Foi observado um decréscimo da média da catalase desde a amostragem inicial até à final. Na peroxidação lipídica, foi observado aumento da média na amostragem final. Foi observado um decréscimo da média da atividade da GST na amostragem final do ensaio e um aumento da média da atividade da tGSH às 6H após a infecção.

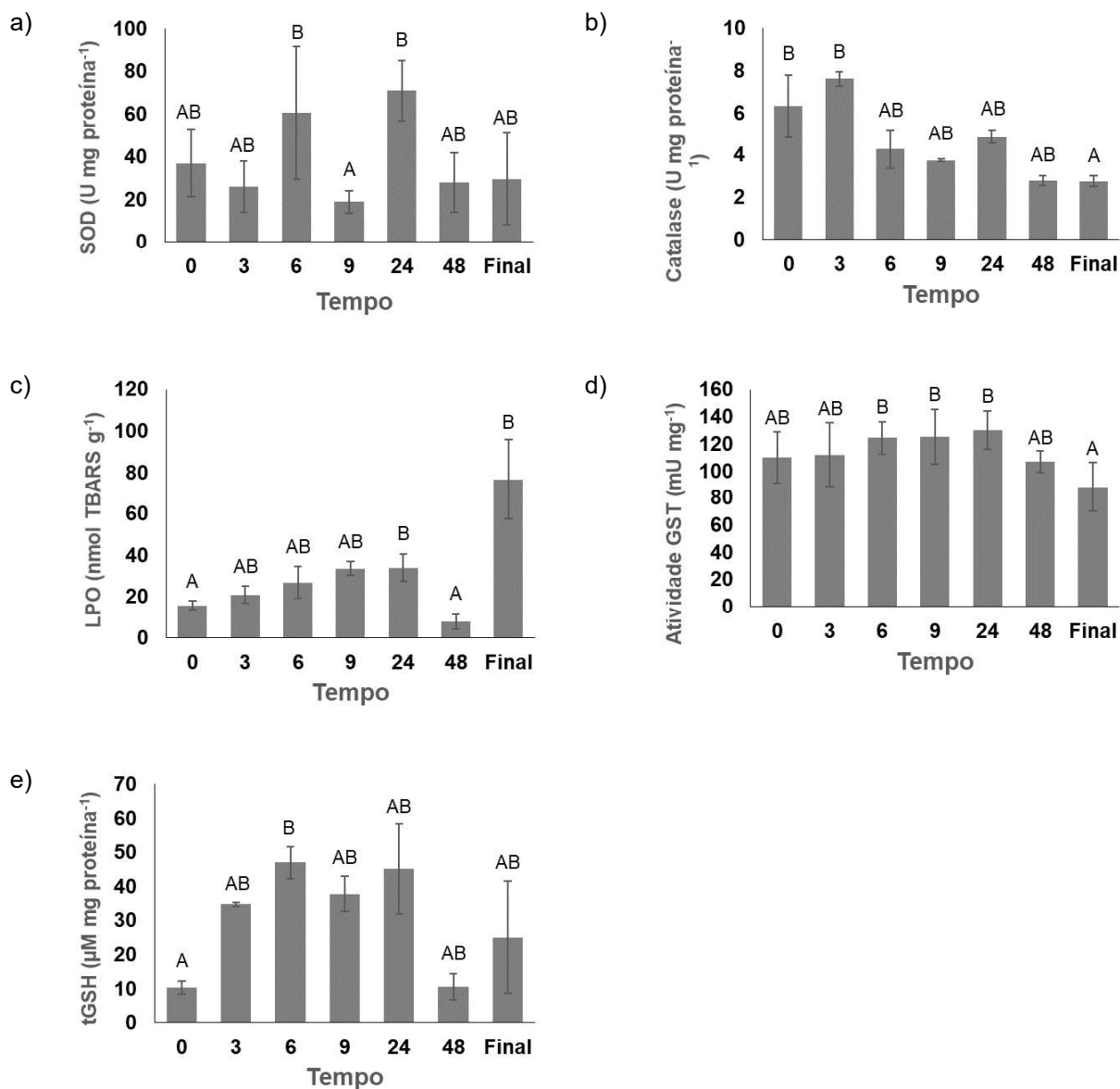


Figura 10: Valores (média \pm desvio padrão) da: a) atividade da SOD, expressa em U mg proteína⁻¹; b) atividade da catalase^a, expressa em U mg proteína⁻¹; c) peroxidação lipídica (LPO)*, expresso em nmol TBARS g⁻¹; d) atividade da GST, expressa em mU mg⁻¹; e) atividade da tGSH*, expressa em μM mg proteína⁻¹ do ensaio C com robalos (*Dicentrarchus labrax*) com peso médio de 25,5 \pm 8,18 g (n = 6). As amostras foram analisadas através da ANOVA, seguindo o teste de Tukey, e através de testes não

paramétricos (*, Método Pairwise; ^a, Método Kruskal-Wallis). Grupos com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, ou seja, $p < 0,05$.

6. Discussão

6.1. Ensaio A e B

Em todos os ensaios realizados, as infeções foram feitas com a dose LD₅₀ obtida em ensaios anteriores, no laboratório de contenção do Cetemares. Nos ensaios A e B, foi utilizada a mesma concentração de *Phdp*, tendo-se observado uma mortalidade significativamente menor no ensaio A do que no ensaio B, mas ambas inferiores a 50%. A mortalidade observada após a infeção, no ensaio A é semelhante à mortalidade obtida após a infeção de indivíduos de *S. aurata* com *Phdp* (11%) (Antonello *et al.*, 2009). No ensaio B, com douradas de menor peso médio, a mortalidade foi observada ao terceiro dia após a infeção. Larvas e juvenis de *S. aurata* são mais suscetíveis à infeção por *Phdp*, enquanto indivíduos de maiores dimensões são mais resistentes (Antonello *et al.*, 2009; Romalde, 2002), o que foi observado quando comparada a mortalidade registada em cada um dos ensaios A e B. Esta diferença é devida ao facto que os macrófagos dos indivíduos de menor peso de *D. labrax* não serem capazes de eliminar a *Phdp*, visto que o seu sistema imune ainda não se encontra totalmente desenvolvido (Noya *et al.*, 1995).

Os neutrófilos são os granulócitos mais abundantes em peixes teleósteos, e são uma componente vital da defesa inata contra organismos patogénicos (Smith *et al.*, 2019). Estas células apresentam a capacidade de produzir espécies ROS para o combate contra patógenos (Biller-Takahashi e Takahashi, 2018; Costas *et al.*, 2013) e possuem um mecanismo acionado pela mieloperoxidase para eliminar bactérias (Ellis, 1999). Relativamente aos resultados obtidos no ensaio A, os valores mais elevados de neutrófilos foram obtidos às 9H, enquanto no ensaio B, foi observado um pico às 24H após a infeção. Os neutrófilos são rapidamente recrutados ao local de infeção, e regressam rapidamente aos valores base (Afonso *et al.*, 1998a; Ellis, 1977). Estes aumentos representam a mobilização dos neutrófilos para o foco de infeção.

Os monócitos são os precursores dos macrófagos presentes nos tecidos, que circulam na corrente sanguínea e são recrutados a focos de infecção, como os neutrófilos, mas com menor velocidade, onde aumentam a população de macrófagos (Afonso *et al.*, 1998b). Os resultados obtidos nos ensaios A e B estão de acordo com esta afirmação, pois o aumento significativo de monócitos foi sempre observado após o aumento nos neutrófilos.

Os valores de leucócitos obtidos nas amostragens iniciais do ensaio A foram menores que os obtidos no ensaio B, mas aumentaram significativamente nas amostragens seguintes, enquanto os valores do ensaio B diminuíram significativamente nas amostragens das 6H e 9H após a infecção. Lusková (1997) e Modrá *et al.* (1998) descreveram que os valores de leucócitos nos peixes dependem de diversos fatores, tais como a idade, sexo, *stress* ambiental e temperatura da água. Isto pode indicar que as diferenças entre os valores de leucócitos nos ensaios A e B podem ser devidas ao facto de os indivíduos do ensaio A serem de um tamanho superior aos do ensaio B (Fazio *et al.*, 2015b).

A peroxidase é uma enzima importante que age como um agente microbicida, eliminando o peróxido de hidrogénio, mantendo o balanço *redox* das células e sistemas imunes (Guardiola *et al.*, 2018). Esta enzima é libertada dos grânulos citoplásmicos dos fagócitos, participando na resposta oxidativa contra patógenos (Alvarez-Pellitero, 2008), sendo considerada um indicador do estado imunológico dos leucócitos circulantes (Lobo, 2016). O aumento significativo do valor médio de peroxidase às 48H no ensaio A pode corresponder a uma resposta dos indivíduos à infecção, enquanto no ensaio B não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tempos de amostragem. A resposta à infecção dos indivíduos de dourada do ensaio B não foi tão intensa como a dos indivíduos do ensaio A. Os neutrófilos são os maiores produtores da peroxidase, no ensaio A tendo-se observado um aumento dos neutrófilos antes do aumento da peroxidase.

No ensaio B foi observada uma diminuição estatisticamente significativa dos valores médios de linfócitos às 6H e 9H após a infecção. Esta diminuição dos valores de linfócitos foi observada em peixes após a infecção com patógenos bacterianos (Balfry *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2007; Lamas e Ellis, 1994), podendo indicar a migração destas células para o local da inflamação (Costas *et al.*, 2013).

Os trombócitos participam na coagulação sanguínea e apresentam atividade fagocítica para defesa do organismo (Silva *et al.*, 2012). Na análise dos trombócitos do ensaio A, foi

observado um aumento do valor médio entre as 6H e as 48H após a infecção. No ensaio B foi observado um aumento do valor médio entre as 3H e as 48H após a infecção, os valores médios tendo sido mais baixos que os obtidos no ensaio A. Os aumentos observados nestes dois ensaios indicam a resposta destas células à infecção, com um aumento da sua atividade no organismo ao longo do tempo.

Os valores médios de eritrócitos obtidos aumentaram às 9H após a infecção no ensaio A, tendo diminuído à mesma hora e às 48H no ensaio B. Indivíduos de cobia (*Rachycentron canadum*) infetados com *Phdp* apresentaram uma diminuição dos valores médios de eritrócitos entre as 6H e 48H após a infecção (Eto *et al.*, 2019), correspondendo à diminuição dos valores obtidos no ensaio B. Um aumento dos eritrócitos, hematócrito e hemoglobina foi observado por (Eslamloo *et al.*, 2014) após um *stress* agudo, tendo sido descrito como uma estratégia para melhorar a capacidade do transporte do oxigénio por parte do sangue durante situações que requerem elevadas quantidades de energia (Caruso *et al.*, 2005; Fazio *et al.*, 2015a), o que pode ter sido a causa do aumento do valor médio de eritrócitos no ensaio A.

Na determinação dos valores de hematócrito, no ensaio A foi observado um aumento da média a partir das amostragens iniciais, podendo ter sido causado pelo aumento da atividade eritropoiética do baço e do rim cranial dos peixes, devido ao *stress* da infecção (Silva *et al.*, 2012). No ensaio B, foi observada uma diminuição significativa do valor médio apenas às 48H após a infecção, o que poderá indicar a deterioração do estado de saúde dos peixes neste tempo (Silva *et al.*, 2012). Estes valores estão de acordo com o estudo de Peixoto *et al.* (2017), em que indivíduos de corvina (*A. regius*) infetados com *Phdp* apresentaram valores mais baixos de hematócrito comparativamente a indivíduos de controlo. Os valores de hematócrito foram significativamente menores no ensaio B do que no ensaio A, sendo que os valores obtidos no ensaio A variaram entre 29-40%, enquanto os valores do ensaio B entre os 19-27%.

As variações observadas nos valores de hematócrito correspondem com as variações observadas nos valores dos eritrócitos de ambos os ensaios. Os valores de hematócrito do ensaio A foram mais baixos que os obtidos por Fazio (2019) ($50,35 \pm 1,18$ %), mas encontram-se na gama de valores obtidos por Fazio *et al.* (2015) (26,00–78,80 %). Os valores obtidos no ensaio B poderão indicar uma ligeira anemia, visto que indivíduos com um hematócrito de menos de 20% se encontram anémicos (Clauss *et al.*, 2008), encontrando-se inferiores aos valores obtidos por Fazio *et al.* (2015).

A hemoglobina é uma das proteínas mais estudadas, presente dentro dos eritrócitos e apresentando a função de transporte de oxigênio (Souza e Bonilla-Rodriguez, 2007). O valor médio da hemoglobina obtido no ensaio A diminuiu às 3H e 24H e no ensaio B aumentou às 3H. Estes resultados demonstram diferentes respostas de indivíduos de dourada de diferentes pesos, podendo ter ocorrido uma diminuição da capacidade de transporte de oxigênio nos indivíduos do ensaio A, e um aumento nos indivíduos do ensaio B. Os valores de hemoglobina foram mais elevados no ensaio A. No trabalho de Fazio *et al.* (2015), os valores de hemoglobina na dourada foram positivamente correlacionados com o peso dos indivíduos, tendo sido observado o mesmo quando comparados os valores obtidos nos ensaios A e B.

A inibição da tripsina representa a capacidade do organismo de contrariar os mecanismos utilizados pelos patógenos para evadir o sistema imune dos peixes (Henry *et al.*, 2018). Nos ensaios A e B, foi observado um aumento significativo da percentagem de tripsina inibida às 48H após a infecção, podendo tratar-se de que o sistema imune dos organismos infectados estaria a evitar a proliferação dos patógenos bacterianos.

A família das superóxido dismutases (SOD), compreendida por três metaloenzimas, é capaz de transformar o O_2^- em H_2O_2 (Barnes *et al.*, 1999), evitando a acumulação do radical livre O_2^- , que é altamente reativo e prejudicial para a célula. O H_2O_2 produzido é eliminado pela catalase, glutathiona peroxidase, e peroxidases ligadas a tiorredoxina, ou é libertado para o citoplasma das células (Brand, 2010; Lambeth, 2004; Li *et al.*, 2016; Schieber e Chandel, 2014). O excesso de H_2O_2 pode reduzir a atividade da SOD, enquanto que o O_2^- pode ser responsável pela redução da atividade da CAT (Bagnyukova *et al.*, 2006). As enzimas antioxidantes, como a SOD e a CAT, desempenham um papel importante na prevenção da formação e procura de radicais livres e outras espécies oxidantes potencialmente tóxicas (Sotoudeh e Mardani, 2018).

A catalase, por outro lado, decompõe H_2O_2 em água e oxigênio, que é produzido em abundância pelos fagócitos, e mantém o balanço entre a produção e eliminação de ROS, processo vital para o funcionamento do sistema de defesa inato (Biller e Takahashi, 2018). No ensaio A, foi observado um aumento dos valores da CAT entre as 0H e as 9H após a infecção e no ensaio B foi observado um aumento dos valores entre as 9H e as 48H após a infecção. Um aumento da atividade da CAT pode estar relacionado com um aumento do H_2O_2

(Birnie-Gauvin *et al.*, 2017), podendo ter ocorrido um aumento da produção de peróxido de hidrogénio por parte dos fagócitos que foram ativados de modo a combater a infeção da *Phdp*. Os valores de CAT obtidos no ensaio B são significativamente mais baixos que os obtidos no ensaio A. Isto pode dever-se ao facto de indivíduos de idade menor apresentarem uma atividade da CAT menor que indivíduos mais velhos, como foi observado em indivíduos de esturjão (Sanz *et al.*, 2001) e salmão-rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Jena *et al.*, 1998).

A GST produzida no fígado está envolvida na destoxificação dos produtos aldeídicos da peroxidação lipídica, convertendo-os em espécies não tóxicas através da sua conjugação com a glutatona (Bagnyukova *et al.*, 2006; Hermes Lima, 2004). Na análise da atividade da GST no ensaio B, foi observado um aumento significativo do valor médio às 6H após a infeção. Este aumento poderá ter sido uma estratégia de modo a que ocorresse a eliminação dos produtos tóxicos provenientes da peroxidação lipídica.

A glutatona total (tGSH) permite verificar os danos efetuados ao organismo provenientes do *stress* oxidativo (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017). No ensaio B, ocorreu uma diminuição significativa dos valores às 24H após a amostragem, indicando que os danos efetuados ao organismo por parte da bactéria diminuíram, por ação da GST, como pode ser observado pelo seu aumento antes das 24H.

6.2. Ensaio C

No ensaio C, observou-se mortalidade mais elevada do que 50%, podendo indicar que a dose de *V. anguillarum* foi demasiado elevada, acima do valor de LD50 para robalos com este peso médio. A percentagem de mortalidade cumulativa obtida neste trabalho é superior aos resultados obtidos por Angelidis *et al.* (2006), que obteve uma mortalidade de 60% na infeção de *D. labrax* com *V. anguillarum* através de infeção intraperitoneal, a uma concentração de 10^6 UFC.

Neste ensaio foram observados valores significativamente baixos de eritrócitos após a infeção, com a exceção do tempo de amostragem final. No estudo de Ercan *et al.* (2013), com robalos infetados com *V. anguillarum* também apresentaram valores mais baixos de

eritrócitos que os de indivíduos do controlo. Esta diminuição pode ser devida à atividade das hemolisinas produzidas pelo *V. anguillarum*, que causam a lise dos eritrócitos no hospedeiro (Frans *et al.*, 2011).

Ocorreu uma diminuição significativa do hematócrito entre o tempo inicial e as 3H após a infeção. Isto pode indicar também um agravamento do estado de saúde dos peixes logo após a infeção (Silva *et al.*, 2012), representado também pela elevada mortalidade observada neste ensaio.

Foi descrito que certos produtos extracelulares de *V. anguillarum* reduzem a quantidade de células brancas e de linfócitos, e que aumentam o número de monócitos em *O. mykiss* (Lamas *et al.*, 1994). Neste estudo, apenas os valores de monócitos corresponderam a esta afirmação, pois ocorreu o aumento dos leucócitos e dos linfócitos no tempo de amostragem final nos indivíduos do ensaio C. Os indivíduos infetados têm a tendência de expressar uma diminuição geral dos parâmetros hematológicos, como dos eritrócitos, hemoglobina, enquanto ocorre um aumento dos leucócitos (Ahmed *et al.*, 2020).

Foi observado um aumento da média dos neutrófilos entre as 6H e as 9H após a infeção, e o valor máximo foi obtido na amostragem final. Este aumento indica a resposta do organismo à infeção e a sua tentativa de eliminar as bactérias invasoras. Indivíduos de *O. mykiss* também apresentaram um aumento do número de neutrófilos quando infetados com *V. anguillarum* (Lamas *et al.*, 1994).

No entanto, o aumento dos monócitos foi apenas observado nos tempos finais de amostragem. Este aumento dos monócitos pode indicar uma resposta hematológica tardia dos robalos à infeção, pois estes são recrutados com menor velocidade que os neutrófilos, e algumas secreções extracelulares de *V. anguillarum* aumentam o número de monócitos circulantes (Lamas *et al.*, 1994).

Foi observada uma diminuição dos valores médios de linfócitos entre o tempo inicial e as 9H. Esta diminuição pode ter ocorrido pela migração dos linfócitos para o local de infeção,

juntamente com os monócitos e neutrófilos. Foi também observado um pico dos valores na amostragem final, podendo indicar que os linfócitos voltaram ao seu lugar de produção.

Foi observado um aumento significativo da percentagem de tripsina inibida às 48H após a infeção, colocando-se a hipótese que o sistema imune dos organismos infetados estaria a evitar a proliferação dos patógenos bacterianos.

Os valores máximos da SOD foram obtidos às 6H e 24H após a infeção. Estes valores podem indicar uma resposta do organismo dos indivíduos de *D. labrax* à presença do *V. anguillarum*, e a sua tentativa de prevenção da multiplicação da bactéria do organismo. Velisek *et al.* (2011) obteve valores de SOD mais elevados em indivíduos de *O. mykiss* (200 U mg proteína⁻¹) que os obtidos neste ensaio.

Foi observada uma diminuição da CAT ao longo do tempo do ensaio, indicativa de stress oxidativo nos indivíduos de robalo (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017). Os valores obtidos neste ensaio são mais elevados que os obtidos por (Kokou *et al.*, 2020) num estudo de suplementação de ração em larvas de *D. labrax* (0,004 U mg proteína⁻¹).

Foi observado aumento significativo da média do LPO na amostragem final (76,64 ± 19,30 nmol TBARS g⁻¹). Este aumento sugere uma neutralização ineficaz das espécies ROS, como observada na diminuição da catalase ao longo do tempo de ensaio. Os valores obtidos neste ensaio foram mais elevados que os obtidos por (Fonseca *et al.*, 2011) num estudo de exposição de *D. labrax* a contaminantes em estuários (0,7 nmol TBARS g tecido⁻¹).

Na análise da atividade da GST, foi observado um decréscimo significativo da média na amostragem final comparativamente aos valores mais elevados, obtidos às 6H, 9H e 24H após a infeção. Estes valores elevados indicam que ocorreu uma elevada atividade da GST na destoxificação dos produtos aldeídicos provenientes da peroxidação lipídica, tendo-se observado uma redução desta atividade na amostragem final.

7. Considerações finais e trabalhos futuros

Em suma, foi possível observar uma interação clara entre os patógenos bacterianos e os organismos estudados e o desenvolvimento da resposta imune e hematológica dos organismos à infecção. Na interação entre a *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* e as douradas de diferentes pesos, os hospedeiros demonstraram diferentes respostas à infecção com o patógeno bacteriano, principalmente nos valores de mortalidade, hematócrito, hemoglobina e catalase. Os indivíduos de dourada de maior peso demonstraram uma resposta mais eficaz à infecção que os indivíduos de menor peso, tendo isto sido observado na comparação dos valores de neutrófilos e monócitos. Relativamente à interação entre o *Vibrio anguillarum* e os indivíduos de robalo, foi possível observar-se a interação da bactéria com o organismo principalmente ao nível dos parâmetros hematológicos, principalmente nos valores de eritrócitos, hematócrito, neutrófilos e linfócitos.

Em estudos futuros, propõe-se o estudo da interação de patógenos bacterianos com diferentes espécies de peixe em fases distintas do ciclo de vida, de modo a observar as diferenças na interação com o patógeno. Poderão ser determinados outros parâmetros de resposta imune, como a atividade bactericida e atividade do complemento. Poderão ser recolhidos órgãos alvos dos patógenos para análise histológica e/ou imunohistoquímica, de modo a observar os danos causados e confirmar a sua presença nos tecidos do organismo. Também seria muito importante avaliar o efeito modulatório da infecção experimental na expressão de genes pro e anti-inflamatórios, de forma a melhorar o conhecimento sobre os mecanismos implicados no combate às doenças.

8. Referências

- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A.E., Silva, M.T., 1998a. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis. Aquat. Organ.* 34, 27–37. <https://doi.org/10.3354/dao034027>
- Afonso, A., Silva, J., Lousada, S., Ellis, A.E., Silva, M.T., 1998b. Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 8, 319–338. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0139>
- Agência Portuguesa do Ambiente, 2019. Relatório do Estado do Ambiente Portugal 2019.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1523, 37–48. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00098-2)
- Ahmed, I., Reshi, Q.M., Fazio, F., 2020. The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review. *Aquac. Int.* 28, 869–899. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00501-3>
- Ahmed, N., Thompson, S., 2019. The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis. *Sci. Total Environ.* 652, 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.163>
- Akayli, T., Aydin, B., Urku, C., Kayalar, O., 2018. Diagnosis of *Vibrio anguillarum* in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Different Methods. *Eur. J. Biol.* 77, 26–31. <https://doi.org/10.26650/eurojbiol.2018.404499>
- Alvarez-Pellitero, P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 171–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.013>
- Andreoni, F., Magnani, M., 2014. Photobacteriosis: Prevention and diagnosis. *J. Immunol. Res.* 2014, 7. <https://doi.org/10.1155/2014/793817>
- Angelidis, P., Karagiannis, D., Crump, E.M., 2006. Efficacy of a *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Organ.* 71, 19–24. <https://doi.org/10.3354/dao071019>

- Antonello, J., Massault, C., Franch, R., Haley, C., Pellizzari, C., Bovo, G., Patarnello, T., de Koning, D.J., Bargelloni, L., 2009. Estimates of heritability and genetic correlation for body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 298, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.022>
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., Swings, J., 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. *Environ. Microbiol.* 7, 1488–1495. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00847.x>
- Avci, H., Birincioğlu, S., Epikmen, E.T., Dereli, M., 2013. Comparative histopathological and immunohistochemical evaluations in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) naturally infected with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 164, 72–79.
- Bagnyukova, T. V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.005>
- Baker, M.A., Cerniglia, G.J., Zaman, A., 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.* 190, 360–365. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90208-Q](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90208-Q)
- Bakopoulos, V., Hanif, A., Poulos, K., Galeotti, M., Adams, A., Dimitriadis, G.J., 2004. The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.* 27, 1–13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00513.x>
- Balfry, S.K., Shariff, M., Iwama, G.K., 1997. Strain differences in non-specific immunity of tilapia *Oreochromis niloticus* following challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Dis. Aquat. Org.* 30, 77–80. <https://doi.org/10.3354/dao030077>
- Baptista, T., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 1996. First occurrence of Pasteurellosis in Portugal affecting cultured Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 16, 92.
- Barnes, A.C., Balebona, M.C., Horne, M.T., Ellis, A.E., 1999. Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology* 145, 483–494. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-2-483>
- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 3403–

3414.

- Biller, J.D., Takahashi, L.S., 2018. Oxidative stress and fish immune system: Phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 3403–3414. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170730>
- Bird, R.P., Draper, H.H., 1984. Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination. *Methods Enzymol.* 105, 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05038-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05038-2)
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S.J., Willmore, W.G., 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish Fish.* 18, 928–942. <https://doi.org/10.1111/faf.12215>
- Blier, P., 2014. Fish Health: An Oxidative Stress Perspective. *Fish. Aquac. J.* 5, 4172. <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000e105>
- Brand, M.D., 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
- Braun, R., Arnesen, J.A., Rinne, A., Hjelmeland, K., 1990. Immunohistological localization of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 13, 233–238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00778.x>
- Caruso, G., Genovese, L., Maricchiolo, G., Modica, A., 2005. Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquac. Int.* 13, 67–73. <https://doi.org/10.1007/s10499-004-9031-5>
- Clairborne, A., 1985. Catalase activity, in: Grenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of Methods of Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 283–284.
- Clauss, T.M., Dove, A.D.M., Arnold, J.E., 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.* 11, 445–462. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.007>
- Colquhoun, D.J., Lillehaug, A., 2014. Vaccination against Vibriosis, in: Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø. (Eds.), *Fish Vaccination*. John Wiley & Sons, Ltd., pp. 172–184. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch15>
- Costa-Silva, D.G., Nunes, M.E.M., Wallau, G.L., Martins, I.K., Zemolin, A.P.P., Cruz, L.C., Rodrigues, N.R., Lopes, A.R., Posser, T., Franco, J.L., 2015. Oxidative stress markers in fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the

- Brazilian Pampa biome. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 15526–15535. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4737-7>
- Costa, J.Z., McCarthy, Perez, O., Ramos, E., Rodriguez, M., Monterroso, O., Riera, R., 2017. Occurrence of *Photobacterium damselae* Subsp. *Piscicida* in sea-cage farmed meagre (*Argyrosomus regius*) in Tenerife, Canary Islands, Spain. Thalassas 33, 65–71. <https://doi.org/10.1007/s41208-017-0022-5>
- Costas, B., Rêgo, P.C.N.P., Simões, I., Marques, J.F., Castro-Cunha, M., Afonso, A., 2013. Cellular and humoral immune responses of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup), following challenge with two *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* strains from different geographical origins. J. Fish Dis. 36, 543–553. <https://doi.org/10.1111/jfd.12033>
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hoseinifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., Joshi, S.K., 2017. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. Rev. Fish. Sci. Aquac. 25, 184–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>
- de Souza, P.C., Bonilla-Rodriguez, G.O., 2007. Fish hemoglobins. Brazilian J. Med. Biol. Res. 40, 769–778. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2007000600004>
- Demircan, D., Candan, A., 2006. Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN Gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 30, 305–310.
- DGRM, INE, 2019. Estatísticas da Pesca 2018. Lisboa.
- Ellis, A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol. 9, 291–308.
- Ellis, A.E., 1990. Serum antiproteases in fish, in: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Muiswinkel, W.B. van (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, Fairhaven, NJ.
- Ellis, A.E., 1977. The leucocytes of fish: A review. J. Fish Biol. 11, 453–491. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04140.x>
- Ercan, M.D., Karataş, S., Turgay, E., Kolukirik, M., Ince, O., Ince, B., 2013. Changes in transferrin gene expression in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) challenged with *Vibrio anguillarum*. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 37, 141–146. <https://doi.org/10.3906/vet-1104-26>
- Erhunmwunse, N.O., Ewere, E.E., 2014. Haematological Indices in Fish Plasma as Indicators of Exposure to a Commonly Used Herbicides. Aust. J. Basic Appl. Sci. 8, 245–250.
- Essam, H., Tayel, S., Torkey, H., 2015. Occurrence and Characterization of *Photobacteria*

- Damselae* in Cultured Marine Fish. Alexandria J. Vet. Sci. 44, 103.
<https://doi.org/10.5455/ajvs.129>
- Essam, H.M., Abdellrazeq, G.S., Tayel, S.I., Torky, H.A., Fadel, A.H., 2016. Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. Microb. Pathog. 99, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.003>
- Eto, S.F., Fernandes, D.C., Yunis-Aguinaga, J., Claudiano, G. da S., Shimada, M.T., Salvador, R., de Moraes, F.R., de Moraes, J.R.E., 2019. Characterization and production of IgY antibodies anti-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Therapeutic and prophylactic use in *Rachycentron canadum*. Aquaculture 513, 734424. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734424>
- Faggio, C., Piccione, G., Marafioti, S., Arfuso, F., Trischitta, F., Fortino, G., Fazio, F., 2014. Monthly variations of haematological parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* reared in Mediterranean land off-shore tanks. Cah. Biol. Mar. 55, 437–443.
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO, 2017. *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). Cult. Aquat. Species Inf. Program. 1–10.
- 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>
- Fazio, F., Ferrantelli, V., Fortino, G., Arfuso, F., Giangrosso, G., Faggio, C., 2015a. The influence of acute handling stress on some blood parameters in cultured sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). Ital. J. Food Saf. 4, 4–6. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.4174>
- Fazio, F., Marafioti, S., Filiciotto, F., Buscaino, G., Panzera, M., Faggio, C., 2013. Blood Hemogram Profiles of Farmed Onshore and Offshore Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) from Sicily, Italy. Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 13, 415–422. <https://doi.org/10.4194/1303-2712-v13>
- Fazio, F., Saoca, C., Casella, S., Fortino, G., Piccione, G., 2015b. Relationship between blood parameters and biometric indices of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* cultured in onshore tanks. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 48, 289–296. <https://doi.org/10.1080/10236244.2015.1041239>
- Fonseca, V.F., França, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species:

- Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat. Toxicol.* 102, 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.018>
- Frans, I., Dierckens, K., Crauwels, S., Van Assche, A., Leisner, J., Larsen, M.H., Michiels, C.W., Willems, K.A., Lievens, B., Bossier, P., Rediers, H., 2013. Does Virulence Assessment of *Vibrio anguillarum* Using Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Larvae Correspond with Genotypic and Phenotypic Characterization? *PLoS One* 8, 2–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070477>
- Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B., Rediers, H., 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *J. Fish Dis.* 34, 643–661. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Garcia, F., Pilarski, F., Onaka, E.M., de Moraes, F.R., Martins, M.L., 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 271, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.021>
- Guardiola, F.A., Bahi, A., Esteban, M.A., 2018. Effects of dietary administration of fenugreek seeds on metabolic parameters and immune status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 74, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.010>
- Guérin-Faubleé, V., Rosso, L., Vigneulle, M., Flandrois, J. -P, 1995. The effect of incubation temperature and sodium chloride concentration on the growth kinetics of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum*-related organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 621–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03108.x>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chemistry* 249, 7130–7139.
- Hawke, J.P., 2012. Photobacteriosis, in: *FHS Blue Book: Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens*. AFS-FHS (American Fisheries Society-Fish Health Section), pp. 1–15.
- Henry, M.A., Gasco, L., Chatzifotis, S., Piccolo, G., 2018. Does dietary insect meal affect the fish immune system? The case of mealworm, *Tenebrio molitor* on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Dev. Comp. Immunol.* 81, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.002>
- Hermes Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry., in: Storey, K.. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. pp. 319–368.

- Hickey, M.E., Lee, J.-L., 2018. A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Rev. Aquac.* 10, 585–610. <https://doi.org/10.1111/raq.12188>
- Holland, M.C.H., Lambris, J.D., 2002. The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 399–420. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0408>
- Jena, B.S., Nayak, S.B., Patnaik, B.K., 1998. Age-related changes in catalase activity and its inhibition by manganese (II) chloride in the brain of two species of poikilothermic vertebrates. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 26, 119–129. [https://doi.org/10.1016/S0167-4943\(97\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4943(97)00038-1)
- Kaplow, L.S., 1965. Simplified Myeloperoxidase Stain Using Benzidine Dihydrochloride. *Blood* 26, 215–219. <https://doi.org/10.15537/smj.2019.9.24484>
- Katzenback, B.A., Katakura, F., Belosevic, M., 2012. Regulation of Teleost Macrophage and Neutrophil Cell Development by Growth Factors and Transcription Factors. *New Adv. Contrib. to Fish Biol.* i, 38. <https://doi.org/10.5772/53589>
- Kokou, F., Bastias, R., Kokkari, K., Katharios, P., Cotou, E., Seimenis, N., Vasilakis, M., Papandroulakis, N., Henry, M., Rigos, G., 2020. Surplus of dietary micronutrients promotes antioxidant defense and improves fin erosions in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fry. *Aquaculture* 523, 735224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735224>
- Labella, A., Berbel, C., Machado, M., Castro, D., Borrego, J.J., 2011. *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*, an Emerging Pathogen Affecting New Cultured Marine Fish Species in Southern Spain, in: *Recent Advances in Fish Farms*. pp. 135–152. <https://doi.org/10.5772/26795>
- Lamas, J., Ellis, A.E., 1994. Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 201–219. <https://doi.org/10.1006/fsim.1994.1019>
- Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D.W., Toranzo, A.E., Anadón, R., 1994. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular productis (ECPs). *J. Fish Biol.* 45, 839–854.
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Li, H., Jiang, W., Liu, Y., Jiang, J., Zhang, Y., Wu, P., Zhao, J., Duan, X., Zhou, X., Feng, L., 2016. The metabolites of glutamine prevent hydroxyl radical-induced apoptosis through

- inhibiting mitochondria and calcium ion involved pathways in fish erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 92, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.007>
- Lobo, G.S.M., 2016. Effect of dietary seaweed supplementation on growth performance, antioxidant and immune responses in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) subjected to rearing temperature and salinity oscillations.
- Lusková, V., 1997. Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. *Acta Sci Brno* 31, 70–78.
- Machado, M., Azeredo, R., Díaz-Rosales, P., Afonso, A., Peres, H., Oliva-Teles, A., Costas, B., 2015. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.024>
- Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994. Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2990–2998. <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2990-2998.1994>
- Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1992. Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2491–2498. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-12-2491>
- Mazon, A.F., Monteiro, E.A.S., Pinheiro, G.H.D., Fernandes, M.N., 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian J. Biol.* 62, 621–631. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400010>
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Mladineo, I., Miletić, I., Bočina, I., 2006. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *J. Aquat. Anim. Health* 18, 51–54. <https://doi.org/10.1577/H05-012.1>
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>
- Modrá, H., Svobodová, Z., Kolárová, J., 1998. Comparison of Differential Leukocyte Counts in Fish. *Acta Vet. Brno* 67, 215–226.

- Noya, M., Magariños, B., Lamas, J., 1995. Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. *Aquaculture* 131, 11–21. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00353-P](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00353-P)
- O'Toole, R., Milton, D.L., Wolf-Watz, H., 1996. Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Mol. Microbiol.* 19, 625–637. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.412927.x>
- Ortega, A., 2013. Cultivo de lubina (*Dicentrarchus labrax*), in: Cuadernos de Acuicultura. Madrid, p. 48.
- Peixoto, M.J., Salas-Leitón, E., Brito, F., Pereira, L.F., Svendsen, J.C., Baptista, T., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P.A., Gonçalves, J.F.M., Ozório, R.O. de A., 2017. Effects of dietary *Gracilaria* sp. and *Alaria* sp. supplementation on growth performance, metabolic rates and health in meagre (*Argyrosomus regius*) subjected to pathogen infection. *J. Appl. Phycol.* 29, 433–447. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0917-1>
- Poulos, C., Bakopoulos, V., Zolota, V., Dimitriadis, G.J., 2004. Histopathological findings after sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) exposure to extracellular products of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* produced in vivo. *Aquac. Res.* 35, 931–936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01086.x>
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 239–248. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00048-2)
- Roberts, R.J., 2012. Fish Pathology, Fourth Ed. ed. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2002.tb14791.x>
- Romalde, J.L., 2002. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: An integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int. Microbiol.* 5, 3–9. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0051-6>
- Sanz, A., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Cillero, C., Domezain, A., Domezain, J., Garcia-Gallego, M., 2001. Evolution of antioxidant defenses and lipid peroxidation with age in the sturgeon *Acipenser naccari*, in: Proceedings of the 4th International Symposium on Sturgeon, July 8-13. p. 89.
- Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D., Khan, A.B., Jeevanantham, K., 2012. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. *Comp. Clin. Path.* 21, 275–281. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1091-5>

- Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.* 39, 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling. *Curr. Biol.* 24, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Shefat, S.H.T., 2019. *Vibrio anguillarum*, the Causative Agent of Vibriosis. *Acta Sci. Microbiol.* 2, 6–7.
- Silva, A.S.E. da, Lima, J.T.A.X. de, Blanco, B.S., 2012. Hematologia em peixes. *Rev. Centauro* 3, 24–32.
- Singh, S., Bala, M., Akanksha, Kanwar, S.S., 2014. Bacteria and Viral diseases in fish & shrimp. *Int. J. Microbiol. Allied Sci.* 1, 46–77.
- Smith, N.C., Rise, M.L., Christian, S.L., 2019. A Comparison of the Innate and Adaptive Immune Systems in Cartilaginous Fish, Ray-Finned Fish, and Lobe-Finned Fish. *Front. Immunol.* 10, 2292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>
- Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.* 6, 197–208. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1974.tb04537.x>
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G., 1964. Pasteurella Sp. From an Epizootic of White Perch (*Roccus americanus*) in. *J. Bacteriol.* 88, 1814–1815.
- Sotoudeh, E., Mardani, F., 2018. Antioxidant-related parameters, digestive enzyme activity and intestinal morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry fed graded levels of red seaweed, *Gracilaria pygmaea*. *Aquac. Nutr.* 24, 777–785. <https://doi.org/10.1111/anu.12606>
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Gram, L., 2000. Proliferation and location of *Vibrio anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 23, 423–427. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00257.x>
- Thompson, K.D., 2017. Immunology: Improvement of Innate and Adaptive Immunity, in: *Fish Diseases, Prevention and Control Strategies*. pp. 3–19.
- Thune, R.L., Stanley, L.A., Cooper, R.K., 1993. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3, 37–68. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90028-A](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90028-A)
- Toranzo, A.E., 2004. Report about fish bacterial diseases., *Mediterranean aquaculture*

diagnostic laboratories.

- Toranzo, A.E., Barja, J.L., 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Organ.* 9, 73–82. <https://doi.org/10.3354/dao009073>
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B., Barja, J.L., 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99, 1–15. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90284-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90284-E)
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>
- Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Magariños, B., Barja, J.L., 2009. Present and future aquaculture vaccines against bacterial fish diseases, in: *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture*. pp. 155–176.
- Vale, A. do, Marques, F., Silva, M.T., 2003. Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 129–144. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00144-4](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00144-4)
- Vale, A. do, Silva, M.T., Dos Santos, N.M.S., Nascimento, D.S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A.E., Azevedo, J.E., 2005. AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Mol. Microbiol.* 58, 1025–1038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04893.x>
- Velisek, J., Stara, A., Li, Z.H., Silovska, S., Turek, J., 2011. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture* 310, 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010>
- Weber, B., 2010. Stress response and virulence in *Vibrio anguillarum*.
- Yano, T., 1996. The Nonspecific Immune System: Humoral Defense, in: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. Academic Press, Inc., pp. 105–157. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60273-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60273-3)