

**Efeito da filtração de ostras (*Magallana gigas*), em
cultivos multitróficos integrados na ocorrência do
parasita *Amyloodinium ocellatum***

Patrícia Domingues Canhão



ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

**Efeito da filtração de ostras (*Magallana gigas*), em
cultivos multitróficos integrados na ocorrência do
parasita *Amyloodinium ocellatum***

Patrícia Domingues Canhão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Doutora Florbela Benjamin Soares,
Doutora Cátia Lourenço Marques e da Especialista Teresa Maria Coelho Baptista.

[2022]



Vista aérea da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão do IPMA onde foi realizado este trabalho.

Este trabalho foi realizado na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do IPMA utilizando ostras crescidas nesta Estação e financiado pela mesma e pela Escola Superior de Turismo e Tecnologias do Mar (ESTM), que disponibilizam as infraestruturas e meios disponíveis para o cultivo, amostragens biológicas e análises laboratoriais. Ao IPMA e ESTM reserva-se o direito de utilizar toda a informação nela contida para efeitos de publicações, relatórios da entidade financiadora e divulgação ao público em geral.

Efeito da filtração de ostras (*Magallana gigas*), em cultivos multitróficos integrados na ocorrência do parasita *Amyloodinium ocellatum*

Copyright © Patrícia Domingues Canhão

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar Peniche

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.

Página deixada intencionalmente em branco

Agradecimentos

É com muito orgulho que com a entrega deste trabalho e apresentação posso dizer que sou mestre em aquacultura. Mais uma etapa conquistada que sem dúvida me trouxe muitas aprendizagens tanto a nível pessoal como profissional. Saio deste mestrado com bagagem para enfrentar o mundo profissional e quem sabe prosseguir mais além com os estudos.

Queria agradecer em primeiro lugar aos robalos (robertos e serginhos) dos tanques de infeção pois foram eles que proporcionaram a quantidade necessária de parasitas para realizar o ensaio, e às ostras do ensaio pois sem elas não existiria ensaio nem os resultados importantes que se obteve.

Queria agradecer a toda a equipa da EPPO que me recebeu de braços abertos e que me ensinaram os seus conhecimentos nas diversas áreas existentes nas instalações. Um especial agradecimento à equipa da patologia, a qual contactei mais tempo por o trabalho estar integrado nesta área. À Beatriz Cordeiro e à Carolina Soares (as minhas veterinárias) a team robertos que fizeram tudo para me ajudar com o meu ensaio. Ao Ivo e Íris que me ensinaram todas as técnicas moleculares realizadas no trabalho. Um agradecimento especial à Ana Gamboa que fez todo o tratamento das amostras para a histologia e que digitalizou as lâminas do trabalho. Obrigada 😊

Agradecimentos aos projetos SAUDE&AQUA (MAR-02.05.01-FEAMP-0009) e DIVERSIAQUA II (MAR2020-P02M01- 0656P) da EPPO que financiaram este trabalho.

Agradeço à grupeta que Peniche juntou, Beatriz, Carolina, Diogo e Henrique, que ouviram os desvaneios ao longo deste trabalho e pelos jantares ao longo deste ano. Espero que continuemos a fazer os jantares de vez em quando para nos rimos e pôr-mos a conversa em dia.

Agradeço às orientadoras, Doutora Florbela Benjamin Soares, Doutora Cátia Lourenço Marques e Professora Especialista Teresa Maria Coelho Baptista que leram e releram o trabalho e sempre deram sugestões de melhorias importantes para o trabalho apresentado.

Por último e o mais importante, agradeço à minha família, sem eles isto não era possível, que me apoiaram nas minhas decisões e que me acompanharam ao longo deste ano. E um agradecimento especial ao meu namorado que me ouviu falar muito de todas as etapas deste trabalho e que fez tudo para estar sempre presente mesmo estando longe.

Página deixada intencionalmente em branco

Resumo

A produção em aquacultura e a variedade de espécies cultivadas aumentaram drasticamente nas últimas duas décadas, devido à necessidade de alimentar uma população mundial em constante crescimento. Esta produção de peixes intensiva leva a que ocorram mais frequentemente doenças tanto infeções bacterianas, virais, parasitárias e/ou fúngicas.

A amiloodiniose é uma doença parasitária causada pelo dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum*. É um dinoflagelado eurialino que parasita uma ampla variedade de peixes estuarinos e marinhos. O ciclo de vida do parasita consiste em 3 estágios: o trofante caracterizado pelo estágio de alimentação, o tomonte caracterizado pela fase de cisto, e o dinósporo caracterizado pelo estágio infeccioso que adere às brânquias e pele do hospedeiro. Os sinais clínicos de incluem anorexia, dispneia, hiperplasia, inflamação, hemorragia e necrose. O *A. ocellatum* é transmitido através do contato direto com dinósporos vivos. Os métodos principais de diagnóstico baseiam-se na identificação de tecidos infetados ao microscópio. Para um diagnóstico mais completo, embora dispendioso, recorre-se a técnicas moleculares, como o PCR para a deteção de baixas concentrações do parasita. Esta técnica pode ainda ser considerada como um método de monitorização e controlo de doenças.

Os cultivos IMTA são mais sustentáveis porque são cultivadas várias espécies simultaneamente reduzindo o excesso de nutrientes que iriam para o meio aquático, trazendo um maior rendimento económico para os produtores. No caso dos moluscos bivalves, as espécies normalmente usadas nestes sistemas IMTA, a ostra do Pacífico, *Magallana gigas*, é um importante bivalve cultivado em todo o mundo com interesse económico. Os bivalves filtram e retêm uma imensa quantidade de microrganismos presentes na água das zonas de produção como por exemplo bactérias, fitoplâncton e parasitas que ficam retidos nas brânquias, estômago e glândula digestiva das mesmas. Colocando-se a questão se as ostras filtram o *A. ocellatum*. Posto isto este trabalho vem recolher informação para auxiliar os produtores de aquacultura, que têm perdas económicas grandes devido a este parasita.

Os objetivos principais do estudo são perceber se as ostras poderiam ser usadas como um filtro natural ou se por outro lado atuavam como um vetor de propagação do parasita, e perceber ainda se os dinósporos afetavam os tecidos das ostras e a nível imunológico.

Para isto, usaram-se 144 ostras divididas em dois tratamentos, o controlo (sem parasita) e o infetado (com parasita). Ao longo do ensaio foram recolhidas amostras, nos momentos 0h, 3h, 24h, 96h e 7dias, para análise de parâmetros de resposta imune, histológica, expressão genética e confirmação por PCR.

De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir que as ostras são um vetor de propagação do parasita *A. ocellatum* representando um perigo para as aquaculturas de policultivos, e tem de existir medidas no combate do mesmo, pois representa um grande problema para o setor. Futuramente à uma necessidade de responder a muitas questões que este estudo levantou com os resultados obtidos.

Palavras-chave: Aquacultura, Policultivos, *Magallana gigas*, *Amyloodinium ocellatum*, Parasita, Patologia.

Página deixada intencionalmente em branco

Abstract

Aquaculture production and the variety of species farmed have increased dramatically over the last two decades due to the need to feed a constantly growing world population. This intensive fish production leads to more frequent occurrence of diseases either bacterial, viral, parasitic and/or fungal infections.

Amyloodiniosis is a parasitic disease caused by the dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*. It is a euryhaline dinoflagellate that parasitizes a wide variety of estuarine and marine fish. The life cycle of the parasite consists of 3 stages: the trophon characterized by the feeding stage, the tomon characterized by the cyst stage, and the dinospore characterized by the infective stage that adheres to the gills and skin of the host. Clinical signs include anorexia, dyspnea, hyperplasia, inflammation, hemorrhage, and necrosis. *A. ocellatum* is transmitted through direct contact with live dinospores. The main methods of diagnosis are based on the identification of infected tissue under the microscope. For a more complete, but expensive diagnosis, molecular techniques, such as PCR for the detection of low concentrations of the parasite, are used. This technique can also be considered as a method of disease monitoring and control.

IMTA cultures are more sustainable because several species are cultivated simultaneously, reducing the excess nutrients that would go into the aquatic environment, bringing greater economic return to the producers. In the case of bivalve mollusks, the species commonly used in these IMTA systems, the Pacific oyster, *Magallana gigas*, is an important bivalve cultured worldwide with economic interest. Bivalves filter and retain an immense amount of microorganisms present in the water of the production areas such as bacteria, phytoplankton and parasites that are retained in their gills, stomach and digestive gland. The question arises if oysters filter *A. ocellatum*. Therefore, this work will collect information to help aquaculture producers, who have large economic losses due to this parasite.

The main objectives of the study were to understand if oysters could be used as a natural filter or if they acted as a vector for the spread of the parasite, and to understand if the dinospores affected the tissues of the oysters at the immunological level.

This was done using 144 oysters divided into two treatments, control (without parasite) and infected (with parasite). Throughout the trial, samples were collected at 0h, 3h, 24h, 96h and 7days for analysis of immune response parameters, histology, gene expression and PCR confirmation.

According to the results presented, it can be concluded that oysters are a vector for the spread of the parasite *A. ocellatum*, representing a danger for polyculture aquacultures, and there must be measures to combat it, as it represents a major problem for the sector. In the future there is a need to answer many of the questions that this study has raised with the results obtained.

Keywords: Aquaculture, Polyculture, *Magallana gigas*, *Amyloodinium ocellatum*, Parasite, Pathology.

Página deixada intencionalmente em branco

Índice

Agradecimentos.....	VII
Resumo.....	IX
Abstract.....	XII
Índice de Figuras.....	XVII
Índice de Tabelas.....	XX
Índice de siglas e acrónimos.....	XXI
1. Introdução.....	1
1.1. Perspetiva geral da aquacultura.....	1
1.2. Impacto das doenças em aquacultura.....	3
1.2. Doenças parasitárias em peixes marinhos.....	4
1.3. Aquacultura multitrófica integrada - IMTA.....	5
1.4. Resposta imune dos bivalves.....	7
1.5. Caracterização do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i>	9
1.5.1. Taxonomia do <i>Amyloodinium ocellatum</i>	9
1.5.2. Ciclo de vida do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i>	10
1.5.3. Sinais clínicos.....	12
1.5.4. Transmissibilidade.....	13
1.5.5. Diagnóstico.....	14
1.5.6. Tratamento e prevenção.....	14
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1. Local do estudo.....	19
3.2. Recolha e manutenção do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i>	19
3.3. Pré ensaio- Afinação de técnicas de infeção de ostras.....	20

3.4. Ensaio de infecção das ostras com dinósporos de <i>Amyloodinium</i> <i>ocellatum</i>	24
3.4.1 Análise Histológica	29
3.4.2 Avaliação da expressão genética	30
3.4.3 Confirmação da presença de <i>Amyloodinium ocellatum</i> nas amostras por PCR	32
3.4.4 Resposta imune	33
3.5 Ensaio de viabilidade dos dinósporos de <i>Amyloodinium ocellatum</i> após filtração pelas ostras.....	34
3.6 Análise Estatística	35
4. Resultados	36
4.1 Resultados Pré ensaio – Afição de técnicas de infecção de ostras	36
4.2 Resultados da viabilidade dos dinósporos de <i>Amyloodinium ocellatum</i> após ingestão pelas ostras	41
4.2.1 Análise Histológica.....	41
4.2.2 Avaliação da expressão genética.....	57
4.2.3 Confirmação por PCR da presença de <i>Amyloodinium ocellatum</i> nas amostras de ostra	58
4.2.4 Resposta imune	58
4.3 Resultados ensaio de viabilidade dos dinósporos após filtração pelas ostras nos peixes	61
5. Discussão.....	64
Conclusões e Perspetivas Futuras	71
Referências.....	73
Anexos	i

Índice de Figuras

Figura 1: Produção mundial de aquacultura de animais aquáticos e algas de 1991 a 2020 (FAO, 2022).	1
Figura 2: Composição da produção de aquacultura em águas salobras e marinhas, em 2019 (Rodrigues, 2021).....	2
Figura 4: Diagrama dos fatores que influenciam o aparecimento de doenças na aquacultura, indicando os maiores fatores para a evolução do patógeno, e interações patógeno-hospedeiro intervindo em surtos de doenças em peixes. Adaptado de Moreira et al. (2021).	4
Figura 3: Esquema de um exemplo de aquacultura multitrófica integrada (IMTA) de peixes em jaula circular, bivalves e algas marinhas (Holdt & Edwards, 2014).	6
Figura 5: Ciclo de vida do <i>Amyloodinium ocellatum</i> observado ao microscópio ótico NIKON ECLIPSE Ci H550S: A: Brânquias de <i>Dicentrarchus labrax</i> infetadas com trofontes (40x); B: Tomonte; C: 1ª divisão, 2 células; D: 2ª divisão, 4 células; E: 3ª divisão 8 células; F: 4ª divisão 16 células; G: 5ª divisão 32 células; H: 6ª divisão, 64 células; I: Dinósporos; (ampliação total de 100x) Barra de escala: 100µm.	11
Figura 6: Brânquias de peixe infetadas com <i>Amyloodinium ocellatum</i> . Crédito: Paola Beraldo in Beraldo et al., (2021).....	13
Figura 7: Figura representativa da disposição das ostras da espécie <i>Magallana gigas</i> no pré ensaio. Ajuste de técnicas de infecção de ostras.....	21
Figura 8: Esquema do desenho experimental do pré ensaio com ostras (<i>Magallana gigas</i>) para ajuste de técnicas de infecção com <i>Amyloodinium ocellatum</i>	22
Figura 9: Figura representativa da disposição dos tanques do ensaio.	24
Figura 10: Esquema representativo da disposição dos tanques do ensaio.	26
Figura 11: Figura representativa de uma placa de 96 poços de fundo plano com fezes incubadas de <i>Magallana gigas</i>	26
Figura 12: Desenho experimental do ensaio de infecção das ostras <i>Magallana gigas</i> com dinósporos de <i>Amyloodinium ocellatum</i>	28
Figura 13: Esquema representativo do tratamento das imagens histológicas de glândulas digestivas de ostras <i>Magallana gigas</i> , na obtenção das medições de área e perímetro, utilizando o programa ImageJ (Version 1.53K, US National Institutes of Health).	30
Figura 14: Figura ilustrativa da variação da turbidez da água; A: ostra (<i>Magallana gigas</i>) alimentada com <i>Tetraselmis rubens</i> às 0h; B: ostra (<i>Magallana gigas</i>) às 2h.....	36
Figura 15: Fotografias tiradas ao microscópio ótico, das fezes de ostra (<i>Magallana gigas</i>) alimentadas com <i>Tetraselmis rubens</i> A: Tomontes de <i>Amyloodinium ocellatum</i> envolvidos nas fezes (200x); B: Tomonte de <i>Amyloodinium ocellatum</i> observado (200x); C: Dinósporos de <i>Amyloodinium ocellatum</i> (indicados com setas laranjas) em fezes com microalga <i>Tetraselmis rubens</i> (100x); D: Tomontes de <i>Amyloodinium ocellatum</i> (indicados com setas laranjas) envolvidos nas fezes de ostra (100x). Barra de escala: 100µm.....	37
Figura 16: Fotografias tiradas ao microscópio ótico das fezes incubadas numa placa de 96 poços, da ostra 4 e 5 da espécie <i>Magallana gigas</i> , alimentadas com <i>Isochrysis galbana</i> ; A: Tomonte de <i>Amyloodinium ocellatum</i> envolvido nas fezes da ostra 4 (200x); B: Tomonte de <i>Amyloodinium ocellatum</i> envolvido nas fezes da ostra 4 (200x); C: Tomonte de <i>Amyloodinium ocellatum</i> envolvido	

nas fezes da ostra 5 (100x); D: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes da ostra 5 (100x). Barra de escala: 100µm..... 39

Figura 17: Fotografias tiradas ao microscópio ótico das fezes incubadas numa placa de 96 poços, das ostras 2 e 3 da espécie *Magallana gigas*, alimentadas com a microalga *Phaeodactylum tricorutum*; A: Dinósporo de *Amyloodinium ocellatum* (seta preta) (100x); B: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes (200x); C: Tomontes de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes (200x); D: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes (200x). Barra de escala: 100µm. 40

Figura 18: Fotografia tiradas ao microscópio ótico das fezes incubadas numa placa de 96 poços, da ostra do controlo negativo da espécie *Magallana gigas*, alimentada com a microalga *Phaeodactylum tricorutum* (100x); Barra de escala: 100µm. 41

Figura 19: Gráfico de barras da média das pontuações da lesão hiperplasia epitelial nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, ao longo do tempo e por tratamento, grupo controlo e grupo infetado. ANOVA de um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 42

Figura 20: Gráfico de barras da média das pontuações da lesão hipertrofia epitelial nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA de um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 43

Figura 21: Gráfico de barras da média das pontuações da lesão rutura do epitélio nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 44

Figura 22: Gráfico de barras da média das pontuações da infiltração de hemócitos nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 45

Figura 23: Gráfico de barras da média das pontuações de necrose nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 46

Figura 24: Cortes histológicos de brânquias de ostras da espécie *Magallana gigas*, observados ao microscópio ótico com uma ampliação total de: A: 40x; B:40x; C:40x; D:20x; Legenda: A -: Hiperplasia epitelial; B – Hipertrofia Epitelial; C - Rutura do epitélio; D - Inflamação de hemócitos; E – Necrose; Setas azuis: *Amyloodinium ocellatum*. 48

Figura 25: Gráfico de barras da média das pontuações da infiltração e/ou diapedese dos hemócitos na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 49

Figura 26: Gráfico de barras da média das pontuações de enterites na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 50

Figura 27: Gráfico de barras da média das pontuações de fusões lamelares na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 51

Figura 28: Gráfico de barras da média das pontuações de regressões tubulares na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator

foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$)..... 52

Figura 29: Gráfico de barras da média das pontuações de necrose na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$). 53

Figura 30: Cortes histológicos de glândula digestiva de ostras da espécie *Magallana gigas*, observados ao microscópio ótico com uma ampliação total de: A: 40x; B:40x; C:40x; D:20x; Legenda: A -: Hemócitos (Infiltração/diapedese); B – Enterite; C – Fusão Lamelar; D – Regressão tubular; E – Necrose; Círculos azuis: *Amyloodinium ocellatum*. 55

Figura 31: Gel de agarose a 1,5% corrido por eletroforese para a confirmação de *Amyloodinium ocellatum* nas amostras, controlo positivo (CP), brânquia controlo (BC), brânquia infetada (BI), glândula controlo (GC), glândula infetada (GI), controlo negativo (CN)..... 58

Figura 32: Gráfico de barras da média das concentrações de lisozima em $\mu\text{g/ml}$ por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$)..... 59

Figura 33: Gráfico de barras da média em percentagem de tripsina não inibida por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$)..... 60

Figura 34: Gráfico de barras da média das concentrações de óxido nítrico em $\mu\text{mol ml}^{-1}$ por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$)..... 61

Figura 35: Fotografias tiradas ao microscópio ótico de dois arcos brânquias de *Sparus aurata*, contendo trofontes de *Amyloodinium ocellatum* (esferas pretas), com ampliação total de 100x. Barra de escala: $100\mu\text{m}$ 63

Índice de Tabelas

Tabela 1: Taxonomia do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i> (WoRMS, 2021; Guiry & Guiry, 2020).	10
Tabela 2: Lista de primers usados para as análises de expressão genética em ostras da espécie <i>Magallana gigas</i>	31
Tabela 3: Observações relativas ao pré ensaio com ostras da espécie <i>Magallana gigas</i> alimentadas com as microalgas <i>Tetraselmis rubens</i> e <i>Isochrysis galbana</i>	36
Tabela 4: Caracterização histológica do lúmen tubular das ostras da espécie <i>Magallana gigas</i> através da média e desvio padrão dos valores da área, perímetro e circularidade, nos respetivos momentos de amostragem (n=20).	56
Tabela 5: Média e desvio padrão do número médio de trofontes de <i>Amyloodinium ocellatum</i> observados nas brânquias e glândula digestiva das ostras (<i>Magallana gigas</i>) nos respetivos momentos de amostragem no ensaio de infeção das ostras (<i>Magallana gigas</i>) com dinósporos de <i>Amyloodinium ocellatum</i> . As letras a,b e c representam as diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos nos vários momentos de amostragem.	57
Tabela 6: Dados obtidos do ensaio de viabilidade dos dinósporos de <i>Amyloodinium ocellatum</i> após filtração pelas ostras (<i>Magallana gigas</i>). Legenda: I: grupo infetado, 1,2,3: replicados técnicos.	62

Índice de siglas e acrónimos

ANOVA – Análise de variância

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CYP450 – Citocromo P450

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAse - Desoxirribonuclease

DP – Desvio padrão

DTT - Ditioneitol

ecSOD - Extracelular superoxide dismutase

EPPO - Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

EUA - Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FREP - Proteínas relacionadas com o fibrinogénio

HSPs - Proteínas de choque térmico

IMTA - Aquacultura multitrófica integrada

IPMA: Instituto Português do Mar e da Atmosfera

LMR - Limite máximo de resíduos

LPS - Lipopolisacarídeos

MITA - Proteína transmembrana 173

MMLV-RT – Transcriptase reversa

PCR - Reação em cadeia da polimerase

REA - Relatório do estado do ambiente

RLRs - Receptores do gene retinóico I (RIG-I) - induzível em ácido retinóico

RNA - Ácido ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de oxigénio

TLRs - Recetores semelhantes a Toll

TNFs - Fatores de necrose tumoral

UE – União europeia

UV – Luz ultravioleta

1. Introdução

1.1. Perspetiva geral da aquacultura

De acordo com as últimas estatísticas mundiais sobre aquacultura compiladas pela FAO (2022) a produção mundial de aquacultura atingiu um recorde histórico de 122,6 milhões de toneladas de peso vivo em 2020 (Figura 1). A produção total consistiu em 87,5 milhões de toneladas de animais aquáticos, 35,1 milhões de toneladas de algas e 700 toneladas de bivalves para a venda das suas conchas e pérolas.

A produção mundial em aquacultura de espécies animais cresceu 2,7% em 2020 em comparação com 2019. Esta foi dominada pela produção de peixes (57,5 milhões de toneladas), produzidos em aquacultura *indoor* (aquacultura terrestre) (49,1 milhões de toneladas), bem como na aquacultura marinha e costeira (8,3 milhões de toneladas). Depois dos peixes, estavam os moluscos (17,7 milhões de toneladas) – principalmente bivalves; crustáceos (11,2 milhões de toneladas), invertebrados marinhos (525 000 toneladas), tartarugas aquáticas (537 000 toneladas) e sapos (FAO,2022).

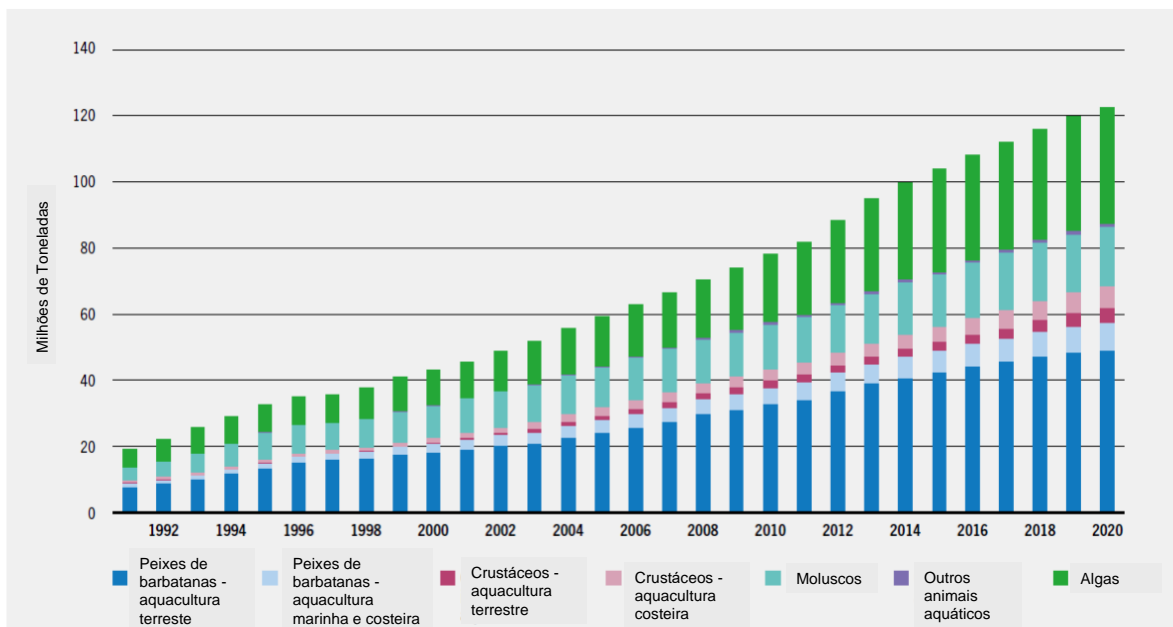


Figura 1: Produção mundial de aquacultura de animais aquáticos e algas de 1991 a 2020 (FAO, 2022).

Em Portugal, de acordo com Rodrigues, S. (2021), analisando a produção nas águas salobras e marinhas, constata-se que a amêijoia (26,9%) e o pregado (29,4%) foram

as principais espécies produzidas em 2019, seguindo-se a dourada (13,5%), as ostras (13,2%), o robalo (7,2%) e o mexilhão (5,5%) (Figura 2). Com menos expressão, aparecem o berbigão (2,0%) e o linguado (1,9%). A produção de moluscos bivalves representou 59.4% da produção total de aquacultura e aumentou cerca de 15.6% em 2019 em comparação a 2018. As amêijoas mantêm-se a espécie mais relevante, seguida das ostras e dos mexilhões, que registaram aumentos de produção de 4,6%, 16,8% e 17% respetivamente.

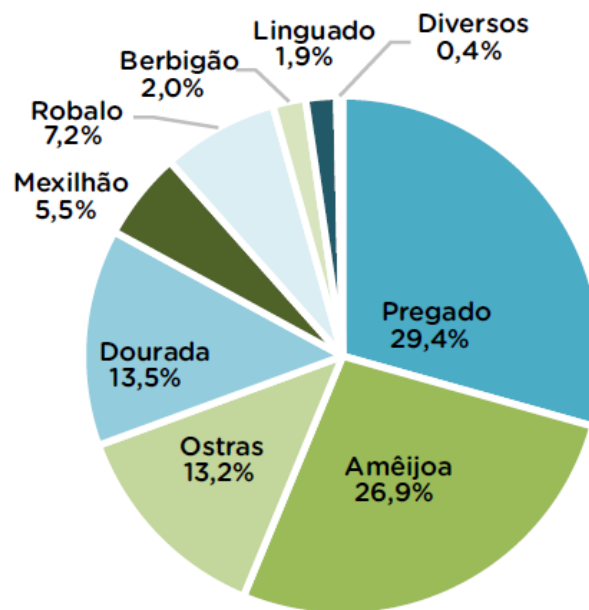


Figura 2: Composição da produção de aquacultura em águas salobras e marinhas, em 2019 (Rodrigues, 2021).

Os portugueses são os terceiros maiores consumidores de peixe no mundo e os primeiros da união europeia. O consumo de peixe em Portugal (55,6 kg/*per capita*/ano) é mais do dobro do consumo médio na união europeia (DOCAPESCA, 2021). O pescado preferencial dos portugueses são a sardinha, a dourada, o robalo, o polvo, o bacalhau, o salmão e mexilhões. Destes, apenas o salmão, a dourada e os mexilhões são maioritariamente provenientes de aquacultura (EUMOFA, 2021). Precisamos assim de aumentar a produção nacional de pescado e outros organismos aquáticos para fazer face à procura de mercado destes produtos por parte dos portugueses. Com este brusco aumento da produção, poderão surgir doenças nas aquaculturas. Este trabalho vem trazer conhecimento em relação a um parasita que comumente afeta os organismos cultivados.

1.2 Impacto das doenças em aquacultura

O crescente aumento do setor da aquacultura é o resultado do aumento exponencial da população mundial que, procura, cada vez mais, por proteína animal para consumo humano (Ranjbar & Khoramian, 2019; Moreira et al., 2021). A aquacultura está a tornar-se numa fonte cada vez mais importante de proteína disponível para consumo humano, uma vez que traz inúmeros benefícios para a saúde dos consumidores. São uma fonte de gorduras boas, como o ómega-3, que aumentam a produção das células de defesa do organismo, fortalecendo o sistema imune, além disso é um alimento rico em vitamina C e vitamina E, contêm propriedades anti-inflamatórias, protegendo o sistema imune de possíveis inflamações (Dijk et al., 2011; Vilavert et al., 2017; Chen et al., 2022). Além destes benefícios o impacto ambiental da produção de animais aquáticos é muito inferior comparativamente com a produção animal terrestre. Para isso, a escala de produção da aquacultura e a variedade de espécies cultivadas aumentaram dramaticamente nas últimas duas décadas e a tendência é continuar a aumentar. A produção apresenta sempre um risco de perda por doenças infecciosas, sendo os peixes de aquacultura, devido às práticas de cultivo, mais vulneráveis do que os peixes selvagens a doenças provenientes de uma ampla gama de infeções bacterianas, virais, parasitárias e fúngicas (Soeth et al., 2013; Nozzi et al., 2016; Gómez & Gast, 2018). Além disso, a tendência para sistemas de produção de maior densidade, as perturbações em sistemas ecológicos, o equilíbrio relacionado com a poluição e com as mudanças climáticas (Figura 4) e o aumento das transações nacionais e internacionais de produtos da aquacultura e os seus derivados contribuíram para alterações na dinâmica de interação entre organismos, agentes infecciosos e pessoas, de forma a reduzir o impacto ecológico e a pegada de carbono. Isto influencia as taxas de replicação e proliferação de patógenos, levando a uma distribuição geográfica mais ampla de agentes patogénicos e a um aumento nas espécies afetadas por surtos de doenças. Isto torna os surtos de doenças uma restrição importante para esta indústria, com um impacto significativo na qualidade, segurança e volume do pescado

produzido em todo o mundo, que pode levar à exclusão do acesso ao mercado e grandes perdas económicas para os produtores (Moreira et al., 2021).

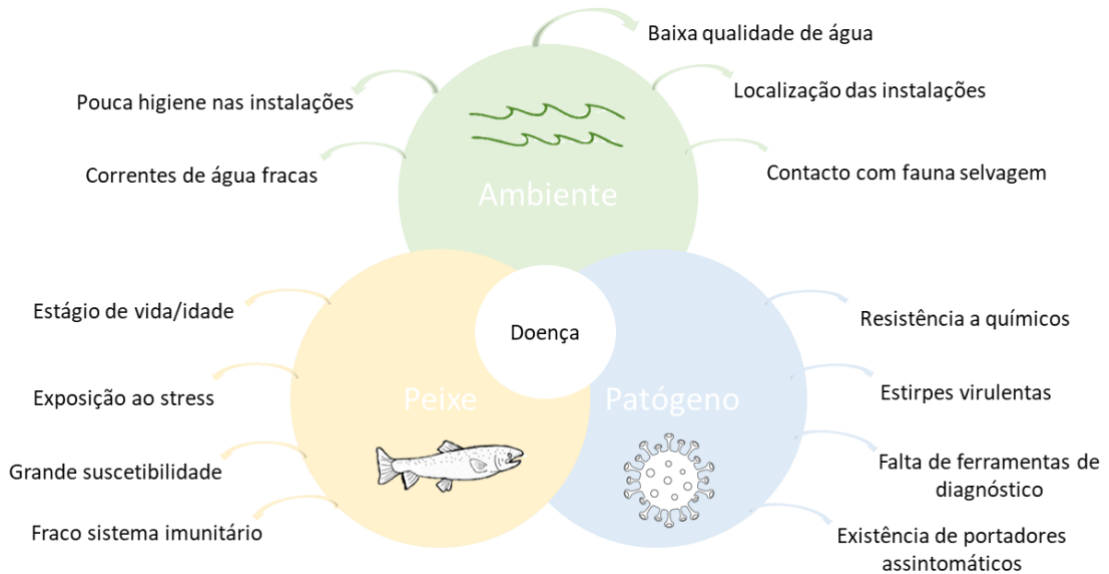


Figura 3: Diagrama dos fatores que influenciam o aparecimento de doenças na aquacultura, indicando os maiores fatores para a evolução do patógeno, e interações patógeno-hospedeiro intervindo em surtos de doenças em peixes. Adaptado de Moreira et al. (2021).

1.2. Doenças parasitárias em peixes marinhos

Os parasitas aquáticos atraíram pouca atenção até que o desenvolvimento em larga escala da aquacultura intensiva no início dos anos 1970 criou um surto de interesse em doenças parasitárias, resultando num aumento do conhecimento e compreensão dos parasitas de organismos aquáticos em geral. A mortalidade tem custos evidentes determinados pelo tamanho e idade dos peixes, mas, mais frequentemente, a infeção do parasita causa morbidade e perda de apetite com um desperdício de comida resultante, redução da eficiência de conversão alimentar e taxa de crescimento específica que, ao longo de um período de crescimento numa população de peixes, pode ser responsável por uma proporção notável na redução dos lucros. Em alguns casos, as infeções parasitárias podem ser zoonóticas ou reduzir o valor de mercado devido à sua extensão ou aparência inestética, e isso é conhecido por causar a rejeição de lotes inteiros de peixes, mesmo quando não havia impacto perceptível no bem-estar dos animais; outras infeções parasitárias podem afetar a qualidade dos reprodutores (Sommerville, 2009).

A escassez de taxonomistas com experiência em parasitas aquáticos sempre foi um problema, pois a correta classificação taxonômica dos parasitas de peixes é muito importante para conhecer melhor o seu ciclo de vida, hospedeiros e com mais conhecimento estabelecer protocolos de prevenção e tratamento. Compreender as interações parasita-hospedeiro pode levar a alvos para antibióticos ou outros tratamentos não químicos e o conhecimento do ciclo de vida do parasita é a chave para fazer a intervenção apropriada no momento certo. Muitos parasitas têm ciclos de vida complexos e o conhecimento da localização das fases de transmissão e vetores é essencial para a prevenção da infecção e o manejo da doença sem o uso de antibióticos ou produtos químicos. No entanto, comumente, o método de escolha para o controle de problemas parasitários em peixes tem sido a quimioterapia, apesar da disponibilidade de uma variedade de métodos não invasivos (Sommerville, 2009; Tahraoui et al., 2018). Os métodos clássicos nem sempre resultam na identificação de parasitas e por isso, para que o diagnóstico seja o mais correto possível recorre-se, cada vez mais, a técnicas moleculares, como por exemplo a técnica de PCR, que utilizam os ácidos nucleicos – ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) – provenientes de amostras biológicas.

1.3. Aquacultura multitrófica integrada - IMTA

Para tornar a aquacultura mais sustentável a longo prazo, tem-se colocado em prática a aquacultura multitrófica integrada (IMTA), sendo uma versão diferente da cultura aquática tradicional (Neori et al., 2007; Ryther, 2009). A aquacultura multitrófica integrada refere-se à cultura de várias espécies de diferentes níveis tróficos (Kleitou et al., 2018). Esta técnica envolve uma espécie alimentada (como um peixe carnívoro) a ser cultivada simultaneamente com espécies extrativas orgânicas (como bivalves) (Biswas et al., 2020) e espécies extrativas inorgânicas (como algas marinhas) (Troell et al., 2003; Neori et al., 2004; Skriptsova & Miroshnikova, 2011; Samocha et al., 2015; Biswas et al., 2020) (Figura 3). Aqui as perdas de nutrientes de uma espécie são consumos nutricionais para outras (Chopin et al., 2001). Em teoria, esta prática tem o potencial de remover significativamente o excesso de nutrientes do sistema enquanto produz espécies com rendimento econômico (MacDonald et al., 2011; Alexander & Hughes, 2017; Cunha et al., 2019).

O IMTA tem sido amplamente reconhecido como uma grande promessa para a sustentabilidade da aquacultura, pois pode potencialmente impulsionar a eficiência ecológica, aceitabilidade ambiental, diversidade de produtos, lucratividade e benefícios

sociais (OCDE, 2010; Schmidt et al., 2011; Chopin, 2012; Kleitou et al., 2018), existindo assim uma economia circular.

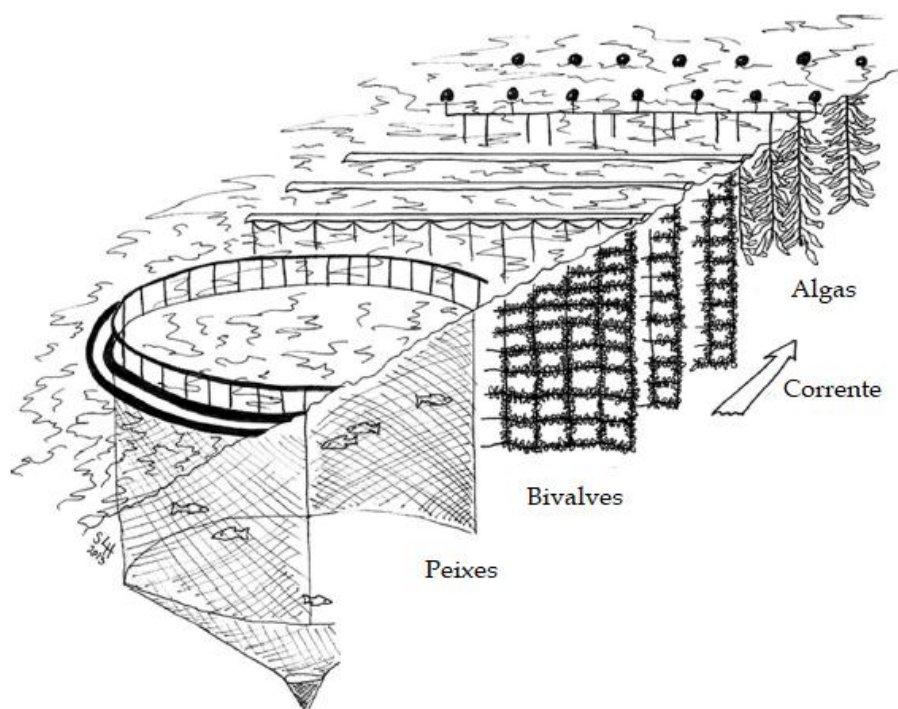


Figura 4: Esquema de um exemplo de aquicultura multitrófica integrada (IMTA) de peixes em jaula circular, bivalves e algas marinhas (Holdt & Edwards, 2014).

No caso dos moluscos bivalves, espécies, normalmente, usadas nestes sistemas IMTA, a ostra do Pacífico, *Magallana gigas*, é uma espécie importante a considerar, uma vez que é cultivado em todo o mundo e tem bastante interesse económico, por ser a espécie de ostra mais difundida e devido à sua alta tolerância às mudanças nas condições ambientais e resistência a patógenos (Omont et al., 2020).

Os bivalves filtram e retêm uma imensa quantidade de microrganismos presentes na água das zonas de produção (Shumway & Parsons, 2016). Uma ostra adulta filtra em média 10 litros de água/hora/g de peso seco, retendo bactérias, fitoplâncton, pequenas larvas de invertebrados e detritos em suspensão na água. Estes são recolhidos ao nível das brânquias que, assim, parecem atuar como uma peneira. O alimento ingerido vai-se depositando no estômago (revestido por células ciliadas e muco) e, posteriormente, é encaminhado para a glândula digestiva, onde sofre digestão intracelular, passando a fração não absorvida para o intestino (Silva, 2017).

1.4. Resposta imune dos bivalves

Sabe-se que os invertebrados possuem mecanismos primários de imunidade passiva, nomeadamente barreiras físico-químicas, tais como esqueletos externos, conchas, cutícula e muco. Este último, apesar da viscosidade e de ser pobre em fontes nutricionais, é rico em peptídeos antimicrobianos tais como defensinas, peptídeos ricos em prolina e proteínas com atividade bactericida/permeabilização da membrana das bactérias (Schmitt et al., 2012). A segunda linha de defesa baseia-se em componentes da hemolinfa, nomeadamente hemócitos circulantes e peptídios antimicrobianos que exibem mecanismos de ação bastante diversos que vão desde a inibição de vias metabólicas à lise das bactérias. Na hemolinfa das ostras também é possível encontrar proteínas homólogas da metaloenzima extracelular superóxido dismutase. Alguns membros desta família de proteínas podem funcionar como opsinas e ligarem-se ao lipopolissacarídeo de bactérias patogénicas como, por exemplo, *Vibrio* spp. Nas brânquias, no manto e no tubo digestivo da *M. gigas* também já foi detetada atividade da lisozima (Bachère et al., 2015).

As ostras são cultivadas em ecossistemas marinhos costeiros altamente impactados por atividades humanas (Adzigbli et al., 2020), nos quais os microrganismos são abundantes e nos quais a temperatura e a salinidade da água do mar são objeto de importantes variações ao longo das estações, e cada vez mais, das alterações climáticas. Nesse ambiente, a aquacultura de ostras sofre com o surgimento contínuo de novas doenças, de difícil controlo (Schmitt et al., 2011). Nas últimas décadas, o surto frequente de infeções por patógenos induziu uma mortalidade massiva e prejudicou tremendamente a indústria de cultivo de ostras (La Peyre et al., 2003; Lallias et al., 2008; Arzul et al., 20009; Han et al., 2021). O conhecimento sobre a imunidade das ostras é necessário para desenvolver estratégias para o controlo de doenças (Han et al., 2021).

Nos invertebrados, o reconhecimento de patógenos e o controlo de doenças são mediados por um sistema imunológico inato, no qual espécies reativas de oxigénio (ROS) e peptídeos antimicrobianos desempenham uma função chave de defesa (Adzigbli et al., 2020). Os invertebrados marinhos como as ostras mantêm um “status” saudável, defendendo-se contra esses potenciais invasores usando mecanismos de defesa inata. Como animais filtradores, as ostras precisam de grandes volumes de água para a sua nutrição e respiração. Consequentemente, estão em contato contínuo com abundantes microrganismos do seu ambiente marinho, que incluem tanto patógenos quanto comensais (Wang et al., 2018).

Surpreendentemente, em ostras saudáveis, muitos órgãos, incluindo a hemolinfa, também são colonizados por uma microbiota natural. Entre outros, é composto por espécies do gênero *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Bacillus* e *Micrococcus* (Schmitt et al., 2011; Schmitt et al., 2012).

A homeostase é a manutenção de um estado estável dentro do corpo em resposta a um ambiente externo em mudança. Sem homeostase, nenhuma forma de vida se poderia adaptar ao seu ambiente. Portanto, manter esse equilíbrio é essencial para que qualquer organismo se mantenha saudável e vivo. Como mencionado acima, o ambiente da ostra está sujeito a mudanças drásticas e rápidas. Portanto, as ostras devem ter um sistema eficiente para manter a homeostase. A homeostase da ostra é mantida por meio de defesas em camadas. A primeira linha de defesa é determinada por barreiras de proteção física que previnem danos aos tecidos subjacentes e infecções por microrganismos patogênicos. As principais barreiras físicas são a concha e o muco. No entanto, quando os patógenos rompem essas barreiras protetoras, eles enfrentam a resposta imune da ostra. Para isso, as ostras desenvolveram mecanismos complexos de reconhecimento e regulação imune para discriminar microrganismos benéficos de patogênicos, controlar infecções e manter a homeostase (Schmitt et al., 2012).

As ostras, invertebrados marinhos, têm um sistema imunológico que se assemelha ao sistema imunológico inato dos vertebrados. Nas ostras, tanto os hemócitos (células sanguíneas circulantes) quanto os epitélios de superfície apresentam funções imunes, expressando tanto receptores de não autorreconhecimento quanto efetores imunes envolvidos no controle da microflora residente/patogênica. As ostras possuem um sistema circulatório semiaberto onde a hemolinfa flui, não apenas dentro de vasos, mas também em lacunas entre os tecidos, circulando entre as células. A hemolinfa banha os órgãos diretamente fornecendo oxigênio e nutrientes, e é composta de plasma fluido e hemócitos. O sistema circulatório contribui para a capacidade de hemócitos migrarem em direção aos tecidos conjuntivos. Eles migram por diapedese dos vasos sanguíneos e lacunas para a superfície do corpo, particularmente para os epitélios superficiais, como manto e brânquias (Wang et al., 2018).

Com as informações detalhadas do genoma acessíveis (Zhang et al., 2012), a ostra *M. gigas* está a tornar-se um modelo de invertebrado, ideal para investigar a complexa interação entre hospedeiros e patógenos (Han et al., 2021). Alguns genes imunológicos e de defesa do hospedeiro relatados no genoma da ostra incluem, entre outros, lectina tipo C, citocromo P450 (CYP450), ferritina, poliubiquitina, proteases, inibidores de proteases,

superóxido dismutase extracelular (ecSOD), proteína relacionada com fibrinogénio (FREP), proteína transmembranar 173 (MITA), recetores semelhantes ao gene 1 induzíveis por ácido retinóico (tipo RIG-1) (RLRs), recetores semelhantes a Toll (TLRs), fatores de necrose tumoral (TNFs) e proteínas de choque térmico (HSPs) (Zhao et al. 2012; Wei et al. 2017; Adzighli et al., 2020).

1.5. Caracterização do parasita *Amyloodinium ocellatum*

A amiloodiniose (“marine velvet disease”, “coral fish disease”) é uma doença parasitária cujo agente etiológico é o dinoflagelado marinho *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931; Ramos & Oliveira, 2001; Picón-Camacho et al., 2013; Ranjbar & Khoramian, 2019). Entre as infeções ectoparasitárias patogénicas que ocorrem em peixes cultivados e em aquários marinhos, a amiloodiniose parece ser um dos mais persistentes e difíceis de controlar, causando extensa mortalidade em aquários públicos e instalações de aquacultura (Brown, 1931; Paperna, 1984; Bower et al., 1987; Colorni, 1994; Cruz-Lacierda et. al., 2004; Noga e Levy, 2006).

O *A. ocellatum* é um dinoflagelado eurialino que parasita uma ampla variedade de peixes estuarinos e marinhos (Marques et al., 2019; Byadgi et al., 2021; Moreira et al., 2021). A ampla tolerância do *A. ocellatum* a condições osmóticas variáveis, combinadas com a sua vasta gama de hospedeiros, foram provavelmente importantes para facilitar o estabelecimento de um sistema de cultura *in vitro* (Noga, 1989, Noga & Bower 1987). Raramente causa epidemias naturais e neste sentido, o surto mais bem documentado foi em peixes num lago interior hipersalino (Salton Sea) no leste da Califórnia, EUA (Kuperman et al., 2001). Estudos genéticos recentes sugerem que isolados de *A. ocellatum* de diversas origens geográficas e de diferentes espécies de peixes são todos a mesma espécie (Levy et al., 2007), mas este assunto tem gerado alguma controvérsia. A maioria, senão todos, os peixes marinhos e de água salobra são suscetíveis ao *A. ocellatum* se as condições ambientais forem favoráveis à sua reprodução, temperatura entre os 23° e os 27° e salinidade entre os 20 e 50 (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Algumas espécies de peixes são naturalmente resistentes à infeção, como *Fundulus grandis*, *Anguilla rostrata* e *Poecilia latipinna*. As espécies resistentes são geralmente aquelas que produzem muco espesso ou podem tolerar baixos níveis de oxigénio (Noga, 2012).

1.5.1. Taxonomia do *Amyloodinium ocellatum*

A. ocellatum pertencente ao filo Myzozoa e é a única espécie pertencente ao género *Amyloodinium* (classe Dinophyceae, ordem Blastodiales, família Oodiniaceae; Tabela 1). Evidências mostram que o *A. ocellatum* tem uma especificidade de espécie hospedeira

muito baixa, sendo isolado de quatro Filos de organismos aquáticos: Chordata, Arthropoda, Mollusca e Platyhelminths (Byadgi et al., 2019).

Tabela 1: Taxonomia do parasita *Amyloodinium ocellatum* (WoRMS, 2021; Guiry & Guiry, 2020).

Taxonomia	
Reino	Chromista
Sub Reino	Harosa
Infra Reino	Alveolata
Filo	Myzozoa
Sub Filo	Dinozoa
Infra Filo	Dinoflagellata
Classe	Dinophyceae
Ordem	Blastodinales
Família	Oodiniaceae
Gênero	<i>Amyloodinium</i>
Espécie	<i>Amyloodinium ocellatum</i>

1.5.2. Ciclo de vida do parasita *Amyloodinium ocellatum*

O *Amyloodinium* é um parasita extracelular que também possui uma fase de vida livre. Liga-se ao hospedeiro usando uma estrutura semelhante a uma raiz (rizoide) que penetra profundamente no epitélio do hospedeiro, causando danos substanciais ao tecido no local de fixação. É um parasita obrigatório, e necessita de peixes para completar o seu ciclo de vida e sobreviva por um período prolongado.

O *A. ocellatum* tem um ciclo de vida simples (Figura 5) (o que significa que nenhum outro organismo além do peixe precisa estar presente para que o parasita complete seu ciclo de vida) (Francis-Floyd & Floyd, 2011). O ciclo de vida consiste em 3 estágios (Cobb et al., 1998; Moreira et al., 2017): 1) trofante que se caracteriza por ser o estágio de alimentação, com 20 a 100 µm de tamanho (Lom e Lawler, 1973; Landsberg et al., 1994; Noga, 2010) que penetra nas células epiteliais por meio dos seus rizoides. Os trofantes são esféricos/ovais, aumentam de tamanho e gradualmente destacam-se dos peixes (Masson et al., 2013). 2) tomonte, fase de cisto, com 20 a 100 µm de tamanho, quando atinge a maturidade cai no substrato inferior e reproduz-se após o trofante se largar do peixe; e 3) dinósporos, com 8–15µm de tamanho, têm dois flagelos que usam para nadar

ativamente, e que são libertados após a divisão do tomonete, é o estágio infeccioso que adere às brânquias e pele do hospedeiro e perde os seus flagelos para dar origem ao trofote (Pereira et al., 2011; Saraiva et al., 2011; Picón-Camacho et al., 2013). Cada tomonete pode produzir até 256 dinósporos, cada um dos quais tem o potencial de infectar um novo hospedeiro e se desenvolver num trofote (Landsberg et al., 1994).

Os tratamentos disponíveis para o combate ao *A. ocellatum* apenas atuam no estágio da vida dinósporo, tanto o trofote quanto o tomonete são resistentes. Assim, e como o tratamento é direcionado aos dinósporos, o tratamento deve ser repetido várias vezes ou por um período prolongado para controlar a infecção (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

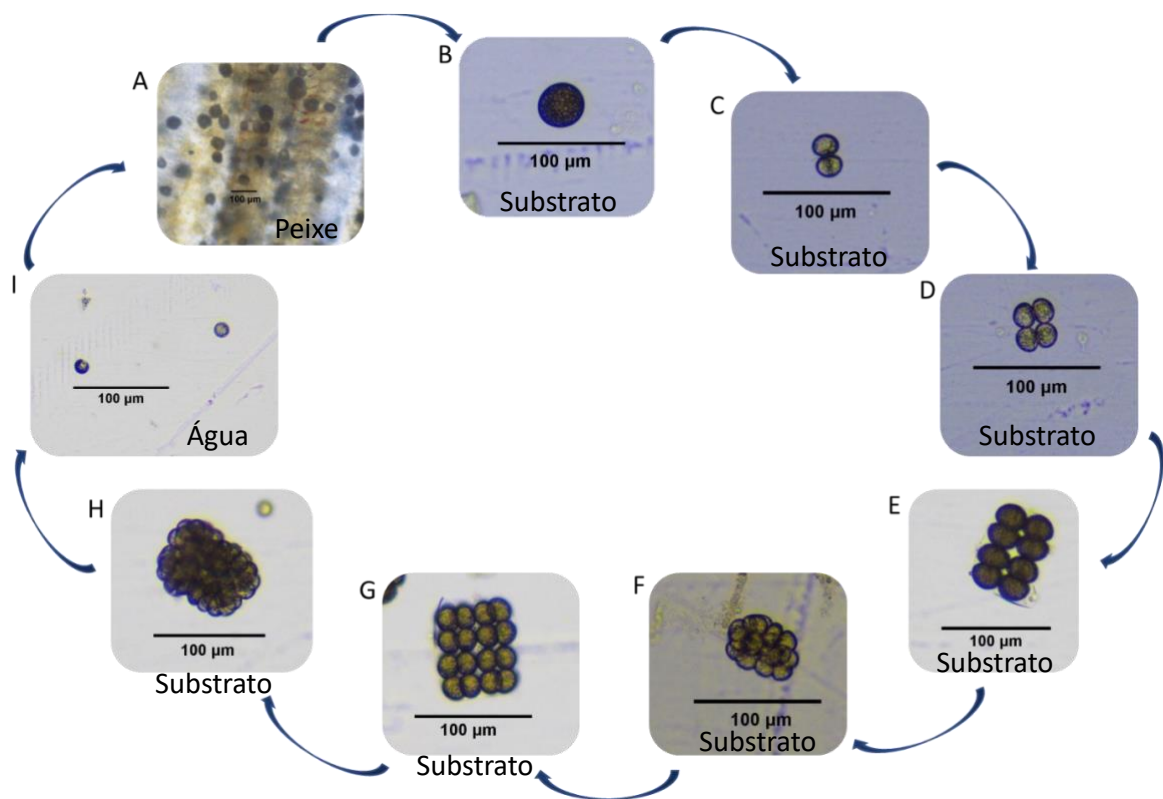


Figura 5: Ciclo de vida do *Amyloodinium ocellatum* observado ao microscópio ótico NIKON ECLIPSE Ci H550S: A: Brânquias de *Dicentrarchus labrax* infetadas com trofontes (40x); B: Tomonete; C: 1ª divisão, 2 células; D: 2ª divisão, 4 células; E: 3ª divisão 8 células; F: 4ª divisão 16 células; G: 5ª divisão 32 células; H: 6ª divisão, 64 células; I: Dinósporos; (ampliação total de 100x) Barra de escala: 100µm.

Paperna (1984) demonstrou que a 25 °C todos os tomonetes se dividiram e produzem dinósporos móveis, levando 2 a 3 dias para esporular em salinidades de 20, 30, 40 e 50 ppt. Masson et al. (2013) considerou 23 a 27 °C como a temperatura ideal para o

desenvolvimento do *A. ocellatum* com base na sobrevivência e fecundidade do parasita. Assim, em regiões mais temperadas existe infecção apenas nos meses mais quentes, sendo que a reprodução do parasita cessa entre os 15-17 °C (Kuperman et al., 2001; Francis-Floyd & Floyd, 2011; Noga, 2012; Moreira et al., 2017).

1.5.3. Sinais clínicos

Os sinais clínicos de amiloodinose incluem anorexia, dispneia, hiperplasia, inflamação, hemorragia e necrose (Noga, 2010). A atividade alimentar e o desprendimento de grande número de trofontes geram mortalidades elevadas como consequência do desequilíbrio osmorregulatório e de infecções bacterianas secundárias (Noga, 2012). Os sintomas, no entanto, não ocorrem, normalmente, até que infecções graves sejam estabelecidas e a mortalidade seja iminente. Como resultado, os tratamentos geralmente são pouco eficientes (Masson et al., 2013; Picón-Camacho et al., 2013).

As brânquias são geralmente o local principal de infestação (Figura 6), mas grandes infestações também podem envolver a pele, barbatanas e olhos. A pele fortemente infetada pode ter uma aparência empoeirada, daí, a doença às vezes ser chamada de 'doença de veludo vermelho', mas este é um achado incomum e os peixes muitas vezes morrem sem lesões cutâneas visíveis. Infecções leves (por exemplo, um ou dois trofontes por filamento branquial) causam pouca patologia. No entanto, infecções graves (até 200 trofontes por filamento branquial) causam hiperplasia branquial grave, inflamação, hemorragia e necrose (Byadgi et al., 2019). Um único dinósporo pode-se alimentar de múltiplas células epiteliais simultaneamente (Paperna, 1980; Noga, 1987). A morte é geralmente atribuída à anoxia e pode ocorrer em 12 horas com uma infecção especialmente forte (Beraldo et al., 2021). Em contraste, a mortalidade aguda às vezes está associada a infecções aparentemente leves, sugerindo que a hipoxia pode não ser sempre a causa da morte. O comprometimento osmorregulatório e infecções microbianas secundárias devido a dano epitelial grave também podem ser uma causa importante de debilitação e morte (Noga, 2012; Byadgi et al., 2019).



Figura 6: Brânquias de peixe infetadas com *Amyloodinium ocellatum*. Crédito: Paola Beraldo in Beraldo et al., (2021).

1.5.4. Transmissibilidade

O *A. ocellatum* é transmitido através do contato direto com dinósporos vivos. Assim, a infecção pode ser disseminada por meio de água contaminada com dinósporos vivos (Roberts-Thompson et al., 2006). Também é provável que o parasita seja transmitido por objetos ou operadores (redes, mãos, sapatos, equipamentos, etc.) que entraram em contato com água contaminada. Os peixes mortos também podem ser um reservatório para *A. ocellatum*, pois os trofontes podem cair no sedimento e dividir-se para formar tomontes, ou podem mesmo dividir-se nos peixes mortos. Por este motivo, é aconselhável remover os peixes mortos o mais rápido possível do sistema. Se possível, o fundo do tanque também deve ser rotineiramente sifonado para remover tomontes, ajudando a reduzir o número de dinósporos potencialmente infecciosos. No caso de serem tanques de terra onde a prevalência desta doença é mais frequente este procedimento não é possível. Minimizar o movimento de parasitas nas instalações de cultura é um elemento-chave de saúde preventiva, como enxaguar os pés, redes e separação física são formas de evitar o

movimento desses minúsculos estágios infecciosos e parasitários para áreas onde existem peixes não infetados (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

1.5.5. Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico atuais baseiam-se principalmente na identificação microscópica de tecidos infetados (brânquias e pele) (Noga, 2010, 2012). Os peixes devem ser examinados enquanto ainda vivos ou imediatamente após a morte, pois os parasitas soltam-se, frequentemente, logo após a morte do hospedeiro. É importante obter um diagnóstico preciso para uma estimativa da gravidade da infestação. A olho nu, os parasitas são melhor observados usando iluminação indireta, como uma lanterna em cima dos peixes numa sala escura. A observação de peixes contra um fundo escuro também ajuda. Embora o diagnóstico presuntivo de infeção possa às vezes ser feita a partir da clínica geral, a identificação microscópica de trofontes ou tomontes é necessária para o diagnóstico definitivo. Levantar o opérculo permite examinar as brânquias. Os trofontes podem ser removidos escovando suavemente ou raspando a pele ou brânquias, seguido por exame microscópico do sedimento. A observação de manchas na pele ou corar o tecido branquial com iodo de lugol diluído também ajuda a diagnosticar os parasitas, uma vez que o iodo reage com os parasitas que contém amido (Noga, 2012; Bessat & Fadel, 2018).

Embora dispendioso, pode ser útil recorrer ao diagnóstico através da técnica de PCR (reação em cadeia de polimerase) para a deteção de concentrações mais baixas de parasita e para a confirmação de que patógeno está a infetar o hospedeiro. Esta técnica pode ainda ser considerada como um método de monitorização e controlo de doenças (Canier et al., 2020; Ríos-Catro et al., 2022; Sueiro et al., 2022).

Em Portugal, a doença foi diagnosticada pela primeira vez em 1994 em dourada (*Sparus aurata*) criada em aquacultura (Menezes, 1994) e posteriormente em populações naturais de robalo (*Dicentrarchus labrax*) da lagoa costeira de Óbidos e do estuário do Sado (Menezes, 2000; Ramos & Oliveira, 2001). Desde o início de 2000 tem sido detetado todos os anos em explorações piscícolas portuguesas, causando elevada mortalidade em douradas, robalos e, mais recentemente, no pregado (*Psetta maxima*) (Soares et al., 2012).

1.5.6. Tratamento e prevenção

Em geral, o tratamento envolve matar os dinósporos que nadam livremente antes que eles possam agarrar-se a um novo peixe hospedeiro ou remover/matar os trofontes dos peixes, quebrando assim o ciclo de vida (Bessat & Fadel, 2018). Devido ao facto de o parasita possuir um ciclo de vida composto por vários estágios, vários tratamentos ou

tratamentos prolongados (> 10 a 14 dias) serão necessários para controlar completamente um surto de *A. ocellatum*. Compreender o momento do ciclo de vida é essencial para saber quando devem ser repetidos os tratamentos necessários (Bessat & Fadel, 2018). As condições ambientais afetam a velocidade com que o parasita completa o seu ciclo de vida e o período em que os dinósporos são infetantes. Em condições ideais, *A. ocellatum* deverá completar o seu ciclo de vida em 12 dias ou menos. Os trofontes permanecem presos aos peixes por 2 a 5 dias, embora alguns indivíduos possam desprender-se em 24 horas. Com estes parâmetros em mente, parece prudente repetir o tratamento medicamentoso diariamente, a menos que se use um composto que permaneça continuamente ativo durante todo o período de tratamento. Os tratamentos para peixes destinados ao consumo humano são muito mais restritos do que aqueles para peixes de aquário ou de exibição, devendo ter-se especial atenção às quantidades e ao químico que se usa nos tratamentos (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

O *A. ocellatum* não é muito suscetível a tratamentos farmacológicos, no entanto, sabe-se que o estágio do dinósporo é inativado pelo tratamento de água doce (Nozzi et al., 2016). Um curto banho de água doce de até 5 minutos desaloja a maioria, mas não todos os trofontes (Landsberg et al., 1994; Abreu et al., 2005; Noga, 2012). Alguns métodos que permitem controlar os surtos de *A. ocellatum* incluem o uso de tratamentos de banho químico, como sulfato de cobre, formalina, difosfato de cloroquina e peróxido de hidrogénio (Paperna, 1984; Noga e Levy, 2006; Bessat & Fadel, 2018), mas afetam apenas o estágio de dinósporos (Paperna, 1984). Outros tratamentos possíveis tais como: ozono, esterilização por ultravioleta (UV) e o uso experimental de agentes de controlo biológico, como bodiões, guppies ou camarões de salmoura (Bower et al., 1987; Oestmann & Lewis, 1995). Na aquacultura em escala comercial, tratamentos de banho químico são os tratamentos mais viáveis, mas normalmente apenas reduzem a gravidade das infeções, sendo necessários tratamentos repetidos ou de longo prazo (Picón-Camacho et al., 2013). O sulfato de cobre foi recomendado para o tratamento de infeções por *A. ocellatum* em aquários marinhos (Woo, 2007).

No regulamento (EU) N°37/2010 da Comissão Europeia de 22 de dezembro de 2009 com a última redação a 06.05.2021 relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respetiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal, podemos verificar que para o sulfato de cobre não é exigido limite máximo de resíduos (LMR) para todas as espécies destinadas à produção de alimentos.

Em Paixão et al., (2013), no estudo feito sobre os efeitos do tratamento de sulfato de cobre em juvenis de *Hemigrammus* sp. verificou-se que em banhos de 24h com uma solução de sulfato de cobre na concentração de 0,3 mg/L por 3 dias, o tratamento tinha uma eficácia de 100% contra os parasitas, mas, porém, era tóxico para os peixes existindo uma mortalidade de 66,6%.

Por outro lado, no estudo de Owatari et al., (2020) foi testado um tratamento de sulfato de cobre a uma concentração de 0,2mg/L por 10 dias em *Sardinella brasiliensis* e no fim do período de tratamento os peixes não apresentavam sinais clínicos ou presença do parasita *A. ocellatum*, verificando-se assim a eficácia do tratamento, sem causar danos nos peixes.

Muitos outros agentes mostraram sucesso limitado ou nenhum sucesso contra a amiloodinose, e estes incluem clorotetraciclina, tetraciclina, aureomicina, nitrofurazona, nifurpirinol, acriflavina, verde malaquita, simazina, *endothall* ou diuron (Paperna, 1984). Além disso, é importante perceber que mesmo os tratamentos que mostraram eficácia nem sempre são aprovados para uso na alimentação de peixes e os que são aprovados variam consideravelmente de um país para outro (Noga, 2012).

Bower et al., (1987) descobriu que o difosfato de cloroquina antimalárico é muito seguro e eficaz no tratamento da amiloodinose. A cloroquina não tem efeito sobre a divisão do tomonete, mas mata os dinósporos imediatamente após sua excisão. Esta concentração não é tóxica para os peixes, mas é altamente tóxico para micro e macroalgas e para vários invertebrados e, portanto, não é recomendado usar em aquários de exposição, pelo menos como uma formulação à base de água. Apesar da sua eficácia, a cloroquina é muito cara e não está legalmente aprovada para uso em peixes (Johnson, 1984; Noga, 2012).

O envelhecimento da água além do tempo de sobrevivência dos dinósporos e a quarentena de novos peixes por pelo menos 20 dias são medidas adicionais que podem reduzir, mas não eliminar, o risco de introdução do parasita. Os dinósporos permanecem infecciosos por pelo menos 6 dias a 26 °C (Bower et al., 1987) e deve-se dar tempo para que todos os tomonetes esporulem (Noga, 2012; Bessat & Fadel, 2018).

A luz ultravioleta (UV) é um componente importante dos protocolos de desinfecção e saneamento em muitas instalações de aquacultura e aquários públicos. O ozônio (O_3), é uma molécula instável que oxida material orgânico indiscriminadamente. É usado para desinfetar e higienizar a água do aquário e é usado em instalações de aquacultura para minimizar o número de partículas infecciosas (parasitárias, bacterianas, fúngicas, etc.) na

água que podem representar um risco para os peixes de cultura (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Assim tanto o UV como o ozono podem ser usadas como medidas preventivas num sistema contra o *A. ocellatum*.

2. Objetivos

Esta dissertação procura perceber se, as ostras da espécie *Magallana gigas*, comumente produzidas nos mesmos tanques de peixes, quando cultivados em IMTA, podem ser usadas como um filtro natural cessando o desenvolvimento do parasita ou se por outro lado podem atuar como vetor de propagação do mesmo, sendo um perigo ainda maior para as explorações de aquacultura que tendem, cada vez mais, a apostar em policultivos.

Os objetivos deste trabalho são:

- Perceber se as ostras removem os dinósporos da água;
- Perceber se os dinósporos afetam o epitélio branquial e o trato intestinal das ostras;
- Perceber se as ostras são afetadas imunologicamente na presença do parasita;
- Perceber se ao longo dos dias os dinósporos filtrados completam o seu ciclo de vida na ostra;
- Perceber se os peixes podem ser infetados pelo parasita quando na presença de ostras após estas filtrarem os dinósporos;

Para isto será realizado um ensaio de infecção onde serão recolhidas amostras para análise histológica, com o objetivo de perceber se os dinósporos afetam o epitélio branquial e o trato digestivo das ostras, serão recolhidas amostras para análise de expressão genética a nível imunitário, percebendo se as ostras sofrem imunologicamente com a presença do parasita *A. ocellatum*, através da avaliação de parâmetros de resposta imune na hemolinfa das ostras pode-se relacionar com os dados obtidos na expressão de genes. Far-se-á também por PCR a confirmação de que o parasita esteve nos tecidos da ostra durante o ensaio.

Posteriormente é realizado um ensaio de viabilidade dos dinósporos de *A. ocellatum* filtrados pelas ostras onde se verificará se estas infetam peixes novamente ou não.

3. Materiais e Métodos

3.1. Local do estudo

O presente estudo foi desenvolvido na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do Instituto Português do Mar e Atmosfera (IPMA - Av. do Parque Natural da Ria Formosa. Localizada no distrito de Faro. As ostras da espécie *M. gigas* foram recolhidas em tanques de cultivo da EPPO, para a realização dos ensaios (pré ensaio – afinação de técnicas de infeção de ostras; ensaio de infeção das ostras com dinósporos de *A. ocellatum*; ensaio de viabilidade dos dinósporos de *A. ocellatum* após filtração pelas ostras). Para o ensaio da viabilidade dos dinósporos de *A. ocellatum* após filtração pelas ostras usaram-se indivíduos da espécie *Sparus aurata*, douradas, de tanques de cultivo internos da EPPO. As análises laboratoriais de expressão de genes e confirmação por PCR foram realizadas na EPPO. As análises laboratoriais respetivas à resposta imune das ostras foram realizadas no Edifício CeteMares, Politécnico de Leiria, localizado em Peniche no distrito de Leiria.

3.2. Recolha e manutenção do parasita *Amyloodinium ocellatum*

Foram obtidos tomontes de *A. ocellatum* a partir de um sistema de infeção existente, para o efeito, no laboratório de patologia da EPPO (Moreira et al., 2018).

A recolha do parasita a partir de peixes infetados foi efetuada colocando os peixes provenientes do tanque de infeção num balde com água doce durante 1 a 2 minutos, para que os trofontes se possam libertar do(s) peixe(s). De seguida foi feito um banho de água salobra em que se adicionou a mesma quantidade de água doce e água salgada, durante 10 minutos. No final dos 10 minutos o(s) peixe(s) foram devolvido(s) ao tanque inicial.

A água que ficou no balde foi filtrada por dois crivos, primeiro de 125µm e depois de 55µm onde ficaram retidos os tomontes. O crivo de 55 µm foi colocado num gobelet virado ao contrário, de forma que se consiga retirar o que ficou retido na malha. Para limpar o filtro, usou-se um esguicho de água salgada estéril. O conteúdo da lavagem é colocado em tubos *falcon* de 50ml. Caso o volume exceda os 50ml, a separação dos tomontes é feita por decantação, em que, após o assentamento dos tomontes o excesso de água é removido. De seguida foi feita uma observação ao microscópio ótico (NIKON ECLIPSE Ci H550S), de 1ml de cada *falcon* (em triplicado) e procedeu-se à contagem dos tomontes. O cálculo da concentração de tomontes foi feito usando a média de todas as contagens e multiplicando pelo volume total do tubo *falcon*. Para garantir uma distribuição homogénea

dos tomontes, antes de cada contagem é realizada uma homogeneização, por inversão, do conteúdo dos tubos. As contagens foram efetuadas numa câmara de SEDGEWICK-RAFTER CELL S50. Com as contagens obtidas estima-se a quantidade média de tomontes de *A. ocellatum* no sistema, sabendo-se assim o grau de infeção do mesmo.

O protocolo de recolha foi efetuado uma a duas vezes por semana dependendo do nível de infeção do sistema, mas, tem de ser realizado com uma frequência semanal visto que o ciclo de vida completo do parasita demora cerca de 4 a 5 dias.

Os tubos *falcon* com os tomontes já contados são identificados com o dia da recolha e a quantidade por ml, e é adicionado uma mistura de antibióticos Penicilina e Estreptomicina (Sigma Aldrich) numa concentração de 100ppm, antes de serem armazenados num frigorífico a 4°C, para abrandar o desenvolvimento dos tomontes.

3.3. Pré ensaio- Afinação de técnicas de infeção de ostras

Para se proceder ao ensaio com ostras e fazer um mais correto delineamento experimental, foi necessário efetuar um pré-ensaio, quer para determinar o alimento a administrar às ostras, tempo para produção de fezes e aferir o método de identificação e contagem de tomontes/dinósporos de *A. ocellatum*.

Foram utilizadas diferentes quantidades de dinósporos para diferentes ostras para perceber se nos resultados existiriam diferenças entre um grupo infetado com mais quantidade comparado com um grupo infetado com menos quantidade.

Assim, para o efeito, foram recolhidas 6 ostras da espécie *Magallana gigas* de um tanque de terra com produção em IMTA, com um peso médio de 213 ± 49 g. Estas foram depuradas durante 4 dias, a uma temperatura média de $20,8 \pm 0,4^\circ\text{C}$, oxigénio dissolvido de $7,58 \pm 0,94$ mg/L e salinidade de 36, num sistema aberto com o objetivo de eliminar o conteúdo do trato digestivo. A água que entra no sistema passa por um sistema de filtros de areia e por um filtro de cartucho de malha de 0,1mm. As ostras foram numeradas de 1 a 6 e dispostas como se pode ver na Figura 7. Considerou-se a ostra 1 como controlo negativo, ou seja, sem infeção com o parasita *A. ocellatum*.

A ostra 1 não foi infetada visto que esta era o controlo negativo, no entanto, foi alimentada diariamente com microalga *Isochrysis galbana* e feita uma observação das fezes e da água, semanalmente, para verificação da ausência de *A. ocellatum*. Esta foi mantida durante a totalidade dos pré ensaios, 4 semanas.

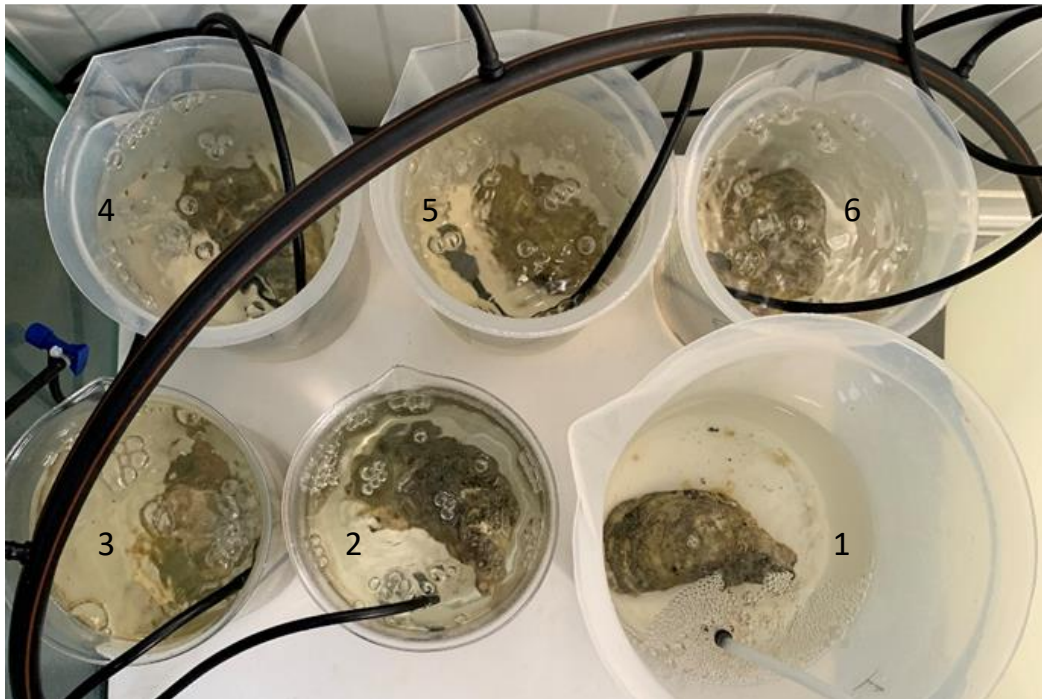


Figura 7: Figura representativa da disposição das ostras da espécie *Magallana gigas* no pré ensaio. Afinação de técnicas de infecção de ostras.

Na figura 8 está representado um resumo do desenho experimental das ostras da espécie *M. gigas* utilizadas no pré ensaio com as respetivas quantidades adicionadas de microalgas e de dinósporos do parasita *A. ocellatum*.

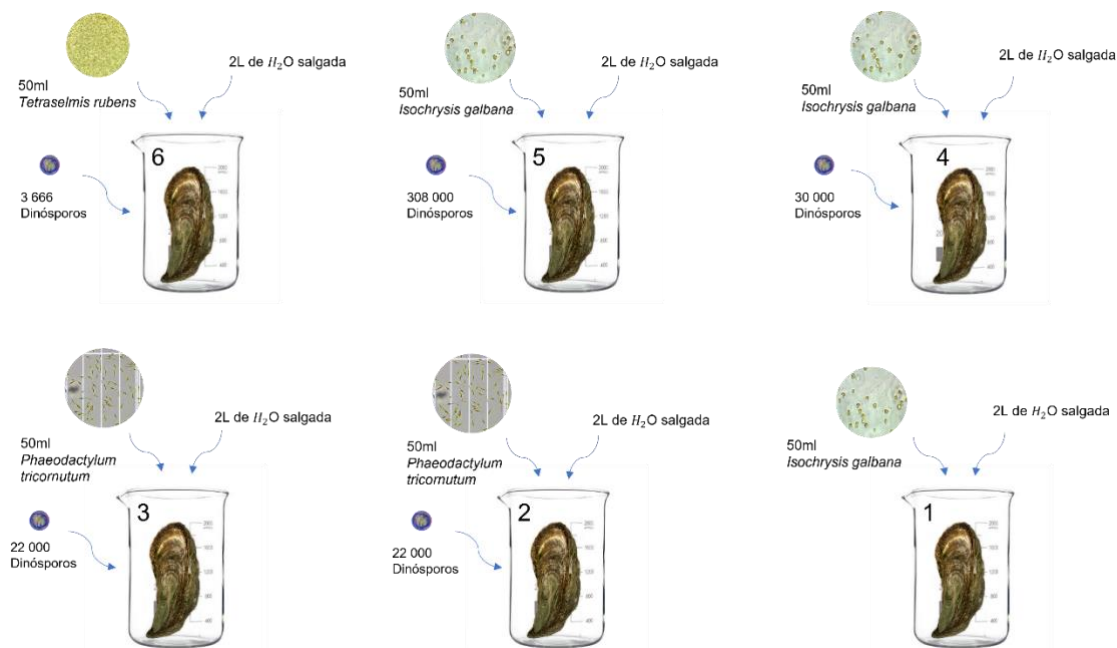


Figura 8: Esquema do desenho experimental do pré ensaio com ostras (*Magallana gigas*) para afinação de técnicas de infecção com *Amyloodinium ocellatum*.

Colocou-se a ostra 6 num gobelet com 2L de água salgada limpa, alimentou-se com 50ml de alga *Tetraselmis rubens* (microalga disponível na EPPO). O objetivo desta alimentação foi verificar o tempo de filtração do alimento e o tempo necessário até à produção de fezes. Depois de se ter iniciado a alimentação, observou-se a ostra, de hora a hora. Fez-se uma recolha das fezes para observação ao microscópio ótico (NIKON ECLIPSE Ci H550S).

Após 4 dias, a ostra 6 foi infetada com uma concentração de 1833 dinósporos/L de *A. ocellatum*, resultantes de tomontes previamente incubados, sem adição de microalga. O número de dinósporos foi contabilizado a partir da quantidade de tomontes inicial.

A determinação do número de tomontes foi efetuada de acordo com o procedimento descrito em cima.

Uma semana após a infecção da ostra 6, foram recolhidas as fezes, o sedimento (partículas e fezes que vão assentando no fundo do gobelet) e água para análise. Estas amostras foram observadas ao microscópio ótico (NIKON ECLIPSE Ci H550S), para verificar a existência de *A. ocellatum*. As fezes recolhidas foram colocadas em tubos *falcon* de 15ml e reservadas num suporte à temperatura ambiente (23°C). Posteriormente, as fezes foram incubadas, numa placa de 96 poços de fundo plano, colocando-se 200µl de

fezes em cada poço, em triplicado, à temperatura ambiente (23°C) e avaliadas ao fim de 3 dias (Figura 11). As ostras restantes (1 a 5) foram reservadas e alimentadas para testes posteriores.

Os ensaios com as diferentes ostras não foram realizados todos ao mesmo tempo porque dependiam de existir parasita que pudesse ser usado para infetar as ostras e de microalgas diferentes para poder testar a que mais se adequaria a este trabalho.

As ostras 4 e 5 foram infetadas na semana seguinte à recolha das fezes da ostra 6, com uma concentração de 15 000 e 154 000 dinósporos/L de *A. ocellatum*, respetivamente, previamente incubados, e alimentadas com 50ml da microalga *I. galbana* (microalga disponível na EPPO), de concentração $6,49 \times 10^5$ cel/ml. Foram feitas as mesmas observações relativamente aos intervalos de tempo de alimentação e aparecimento das fezes. As fezes recolhidas ao longo do tempo foram observadas ao microscópio ótico (Leica ICC50W). As fezes foram incubadas numa placa de 96 poços de fundo plano, colocando-se 100µl de fezes e 100 µl de água salgada estéril (diluição de 50%) em cada poço em triplicado, à temperatura ambiente (23°C) e avaliadas ao fim de 3 dias.

As ostras 2 e 3 foram infetadas na semana seguinte à das ostras 4 e 5, com cerca de 22 000 dinósporos de *A. ocellatum*, previamente incubados, e alimentadas com 50ml da microalga *Phaeodactylum tricornutum* (microalga disponível na EPPO). Foram feitas observações idênticas às feitas nas ostras 6, 5 e 4 relativas aos intervalos de tempo de alimentação e aparecimento das fezes. As fezes recolhidas ao longo do tempo foram observadas ao microscópio ótico (Leica ICC50W). Com estas fezes foi testado um protocolo de lavagem onde se fizeram 2 lavagens por centrifugação, numa centrífuga refrigerada (Hermle Z 383K), por 10 minutos a 150 x g, descartando o sobrenadante entre lavagens e resuspendendo a amostra em água salgada estéril. De seguida retiraram-se 2ml de amostra e colocaram-se 2ml de água salgada estéril em tubos *falcon* de 15ml, centrifugou-se por 10 minutos a 180 x g, repetindo 3 vezes este procedimento, adicionando 15ml de água salgada estéril e descartando o sobrenadante entre repetições. Com as fezes já lavadas foram feitas incubações de diferentes concentrações (50%, 25%, 12,5% e 10%) numa placa de fundo plano de 46 poços em triplicado à temperatura ambiente (23°C), e avaliadas ao longo de 7 dias.

Todas as ostras foram mantidas a uma salinidade de 36, oxigénio dissolvido >6 mg/L e temperatura de $22,6 \pm 0,9^\circ\text{C}$.

3.4. Ensaio de infeção das ostras com dinósporos de *Amyloodinium ocellatum*

Foram recolhidas 144 ostras (média $388,3 \pm 81,2$ g de peso) da espécie *M. gigas* do tanque de terra 5 das instalações da EPPO. Estas foram depuradas em dois tanques retangulares de 300L durante 7 dias com uma temperatura média de $14,6 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$, oxigénio dissolvido de $7,7 \pm 0,2$ mg/L, taxa de renovação de 415L/h, representando uma renovação de 138% de água e salinidade 38. Estes parâmetros foram medidos utilizando uma sonda multiparamétrica B&G SINERGIA®.

As ostras foram distribuídas por 6 tanques, com um total de 24 ostras em cada um dos tanques com um volume de 20L de água salgada, num sistema fechado, a $20,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ de temperatura média, oxigénio dissolvido de $9,3 \pm 3,2$ mg/L, e salinidade 38. Estes parâmetros foram medidos diariamente à mesma hora, utilizando uma sonda multiparamétrica da SINERGIA®. De seguida estas foram divididas em 2 grupos (Figuras 9 e 10), ambos os grupos ao longo dos dias do ensaio foram alimentados com um mix de microalgas, *P. tricornutum* (concentração $8,89 \times 10^5$ cel/ml) e *Skeletonema costatum* (concentração $5,23 \times 10^4$ cel/ml), à exceção do primeiro dia de ensaio onde o grupo dos infetados foi alimentado com o mix de microalgas e com 1000 dinósporos/ml. Ambos os grupos tinham triplicados. A alimentação foi feita diariamente à mesma hora.



Figura 9: Figura representativa da disposição dos tanques do ensaio.

Momentos de amostragem:

- Amostragem inicial, foram amostradas 5 ostras do grupo controlo e 5 ostras do grupo infetado, recolheu-se hemolinfa para análise de parâmetros de resposta imune;
- 3h após a infeção, foram amostradas 9 ostras do grupo controlo e 9 ostras do grupo infetado, recolheram-se amostras de brânquias e glândula digestiva, para análise histológica, expressão genética e para confirmação da infeção por *A. ocellatum* por PCR;
- 24 horas após a infeção, foram amostradas 9 ostras do grupo controlo e 9 ostras do grupo infetado, recolheram-se amostras de brânquias e glândula digestiva para expressão genética de resposta imune;
- 96h após infeção, foram amostradas 9 ostras do grupo controlo e 9 ostras do grupo infetado, recolheram-se amostras de brânquias e glândula digestiva para análise histológica, e foram amostradas 10 ostras do grupo controlo e 10 ostras do grupo infetado, recolheu-se hemolinfa para análise de parâmetros de resposta imune;
- Após 7 dias de infeção, foram amostradas 9 ostras do grupo controlo e 9 ostras do grupo infetado, recolheram-se amostras de brânquias e glândula digestiva para análise histológica e para expressão genética;

Para recolher a hemolinfa das ostras, estas foram previamente anestesiadas de acordo com o protocolo de anestesia de Suquet et al., 2009 (Anexo A). A concentração da solução de $MgCl_2$ é de 50g/L. Foi verificada a salinidade da solução anestésica preparada e ajustada para 37 ± 1 . De seguida introduziram-se as ostras na água com anestésico durante 16h. Ao fim desse tempo, cuidadosamente, usando uma agulha de 0,6*25mm (Henke Sass Wolf, Fine-Ject 23G*1) recolheu-se do músculo adutor 0,5ml a 1ml de hemolinfa, de cada ostra. Colocou-se a hemolinfa em microtubos eppendorf previamente identificados. Após serem realizados os procedimentos, as ostras foram colocadas em água salgada. As amostras de hemolinfa foram mantidas na arca a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, até à realização das análises.

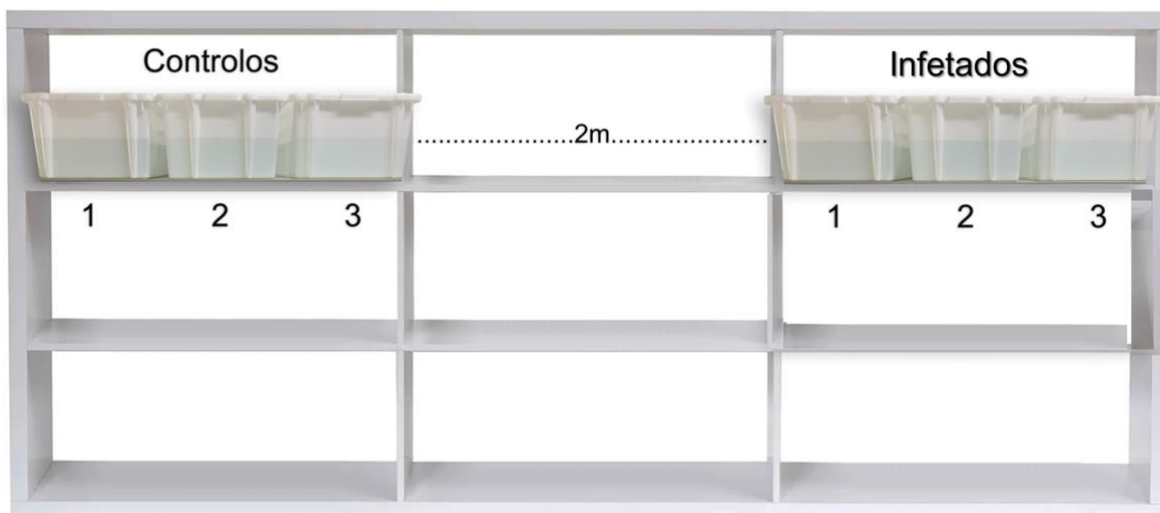


Figura 10: Esquema representativo da disposição dos tanques do ensaio.

Após 3h de infeção, as ostras do grupo infetado foram retiradas da água onde estavam, passadas por água doce e esfregadas com uma escova para eliminar sujidades agarradas à concha e colocadas numa água limpa. Após as ostras terem passado para a água limpa foi feita uma recolha das fezes de cada triplicado de cada grupo ao fim de 3h após o início do ensaio. Fez-se uma recolha de 24h em 24h até ao fim do ensaio, ao décimo dia. As fezes foram incubadas em placas de 96 poços de fundo plano, em triplicado, à temperatura ambiente (23°C), com exposição à luz do laboratório, colocando-se 20µl de fezes e 180 µl de água salgada estéril (diluição de 10%) e avaliadas ao longo de 7 dias (Figura 11).



Figura 11: Figura representativa de uma placa de 96 poços de fundo plano com fezes incubadas de *Magallana gigas*.

A figura 12 representa o desenho experimental resumo do ensaio de infecção das ostras *M. gigas* com dinósporos de *A. ocellatum*.

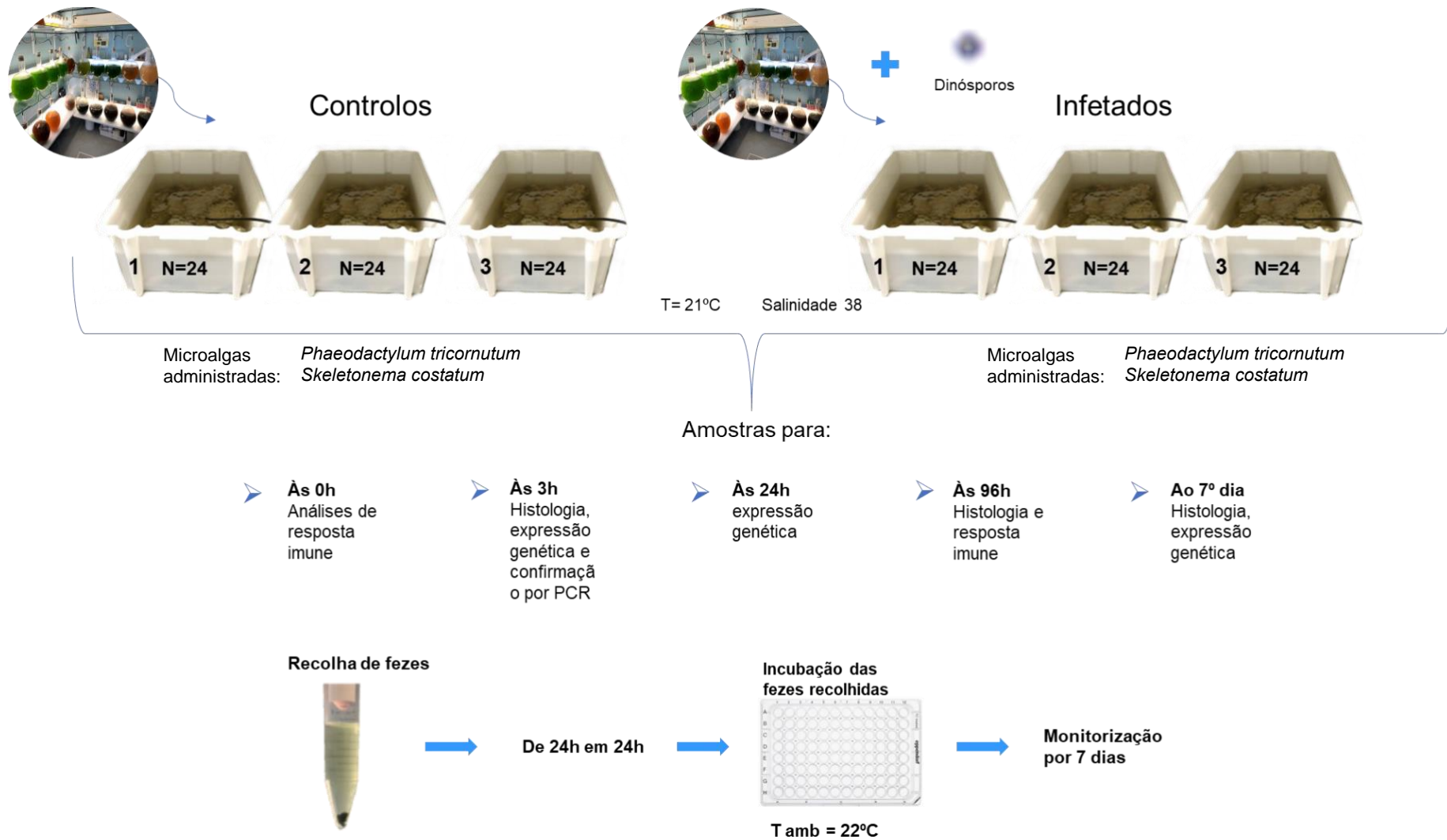


Figura 12: Desenho experimental do ensaio de infeção das ostras *Magallana gigas* com dinósporos de *Amyloodinium ocellatum*.

3.4.1 Análise Histológica

Todas as amostras de brânquias e glândula digestiva das ostras, para análise histológica, foram fixadas com solução de Davidson (Shaw & Battle, 1957; Herbst et al., 2016) (Anexo B), durante 48h e de seguida foram colocadas em etanol a 70%, até ao processamento das amostras.

Para o processamento das amostras seguiu-se o protocolo descrito por (Martoja & Martoja-Pearson, 1970). Brevemente, os tecidos passaram por um processo de desidratação, com o objetivo de substituir a água existente nos tecidos por um meio de impregnação (parafina líquida). O solvente utilizado nesta fase foi o xilol. Finalmente foi feita a impregnação em parafina. Recorreu-se a um processador de tecidos (Model Citadel 2000, Thermo Scientific, Nanjing, China) para obter as lâminas a partir dos blocos de parafina, seccionando-os em cortes finos (4 µm de espessura) com um micrótomo (Model Jung RM 2035, Leica Instruments mb, etzlar, Alemanha). Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (Anexo C) e montadas com DPX (Merck). Antes da observação ao microscópio (Trinocular Axio Lab.A1 da ZEISS), as lâminas foram cuidadosamente limpas.

As brânquias foram classificadas de duas formas, de acordo com Dos Reis et al., (2020): relativamente a que tipo de lesão que exibiam e à intensidade da lesão no tecido observado. Relativamente ao tipo de lesão considerou-se: hiperplasia epitelial, hipertrofia epitelial, rutura do epitélio, inflamação de hemócitos, e necrose. Relativamente à intensidade das lesões foram classificadas da seguinte forma:

- 0 representa que não há lesões na amostra (0%);
- 1 representa lesões suaves/discretas encontradas na amostra (20%);
- 2 representa lesões visíveis encontradas na amostra (40%);
- 3 representa presença de lesões evidentes na amostra (60%);
- 4 representa presença de lesões muito evidentes na amostra (80%);
- 5 representa presença de lesões extramente evidentes na amostra (100%);

Para a glândula digestiva fez-se também a classificação das duas formas como nas brânquias de acordo com Reis et al., (2020). Relativamente ao tipo de lesão considerou-se: hemócitos (infiltração/diapedese), enterite (inflamação nos tecidos interiores), fusão lamelar (fusão das células do lúmen, regressão tubular (perda da aparência dos túbulos) e necrose. Relativamente à intensidade das lesões foram classificadas com os mesmos critérios que nas brânquias.

A partir das imagens histológicas das glândulas digestivas das ostras foram selecionadas 3 secções de lúmen, e em cada seção foram selecionadas 50 zonas do lúmen. Para determinar a área (μm^2), perímetro (μm) dos lumens observados foi utilizando o programa ImageJ (Version 1.53K, US National Institutes of Health). A circularidade é calculada usando a fórmula $4\pi \cdot (\text{área}/\text{perímetro}^2)$, de 0 a 1, sendo 1 um círculo perfeito. Estes procedimentos estão de acordo com Carella et al., (2015). Para cada imagem selecionada, realizou-se a média dos valores recolhidos de cada parâmetro (Figura 13).

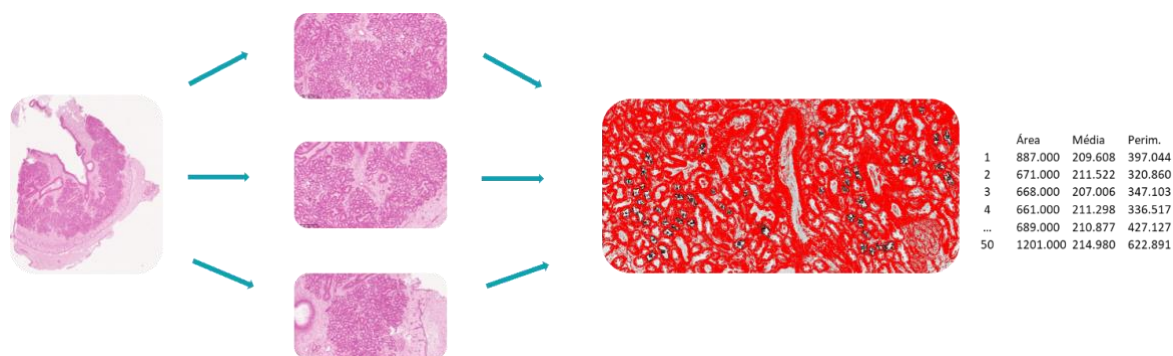


Figura 13: Esquema representativo do tratamento das imagens histológicas de glândulas digestivas de ostras *Magallana gigas*, na obtenção das medições de área e perímetro, utilizando o programa ImageJ (Version 1.53K, US National Institutes of Health).

3.4.2 Avaliação da expressão genética

A extração de RNA (ácido ribonucleico) total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo-se o protocolo indicado pelo fornecedor (Anexo D). Deste modo, colocou-se 200mg de tecido, brânquias e glândula digestiva separadamente, num microtubo *ependorf* juntamente com 1ml de Trizol e homogeneizou-se num TissueLyzer II da QIAGEN durante 40 segundos a uma frequência de 30 rotações/segundo. Incubou-se durante 5min à temperatura ambiente. Adicionou-se 0,2ml de clorofórmio e incubou-se durante 3 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se (Hermle Z 383K), durante 15min a $12.000 \times g$ a 4°C . Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo *ependorf* e adicionou-se 0,5ml de isopropanol (VWR). Incubou-se durante 10min à temperatura ambiente e de seguida centrifugou-se, (Hermle Z 383K) durante 10min a $12.000 \times g$ a 4°C . Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* num mililitro de etanol a 75%. Agitou-se a amostra brevemente e centrifugou-se, novamente, durante 5min a $7.500 \times g$ a 4°C . Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o pellet durante 10min à temperatura ambiente. Por fim, ressuspendeu-se em $50\mu\text{L}$ água milli-Q. Após o processo de extração

faz-se a quantificação da concentração de RNA existente por espectrofotometria (DeNovix DS-11 FX) (Anexo F, Tabela 1).

De seguida, fez-se a síntese de cDNA utilizando o kit de extração de RNA (Thermo Scientific). Foi feito um tratamento com DNase, em microtubos eppendorfs de 0,2ml, colocou-se 1µg de RNA, e perpez-se o volume até 8 µl com água H₂O ultrapura, 1 µl de buffer e 1 µl de Dnase (Qiagen), sendo o volume final de 10 µl. A reação foi colocada num termociclador (Biometra® Personal Cycler) durante 30min a 37 °C. Depois adiciona-se 1 µl de STOP solution na amostra, para inativar a DNase I e coloca-se por 10min a 65 °C. Prossegue-se com a síntese de cDNA à qual se adiciona 1 µl de Oligo dT (Eurofins) (50µM) e 1 µl dNTPs (NZytech) (10mM, cada) seguindo-se de 5min a 65 °C. Em seguida, coloca-se 4 µl de 5x 1st strand buffer (invitrogen), 2 µl de DTT (Ditiotreitol) (Invitrogen) (0,1M) e 1 µl RNase inhibitor (invitrogen) e coloca-se por 2min a 37 °C, por fim coloca-se 1 µl de MMLV-RT (Transcriptase reversa) (invitrogen) e coloca-se 50min a 37 °C seguindo de 15min a 70 °C, para inativar a enzima.

Na tabela 2, são apresentados os primers usados nas análises de expressão genética, com vista à análise de parâmetros de resposta imune das ostras.

Tabela 2: Lista de primers usados para as análises de expressão genética em ostras da espécie *Magallana gigas*.

Nome do Gene	Eficiência (%)	Sequência 5'- 3' F: Sequência Forward (5'-3') R: Sequência Reverse (5'-3')	GenBank Accession number	Referência
β -actin	119,49	F: ATGGATCTCGCTGGACG R: GTTGCCCTGGACTTCG	AF026063.1	Du et al., 2013
Elongation factor 1	99,71	F: GGAGGTATTGGAACAGTGCC R: CACCACGAATCTCTCCCAG	AB122066.1	Wang et al., 2010
CgDNMT3-RT	*	F: CACAGAGAGTTTTCCCTTGC R: GACATTCCTCTCAAGC	XM_011437317	Zhao et al., 2021
EcSOD	**	F: CGGTTTTGTGTCTGCCA R: GGCAACCTCCACCATAGGG	DQ010420	Gonzalez et al., 2005
Cytochrom eP40(CYP3 56A1)	**	F: GTCATCAACCACTGGGC R: CTTCCCTTCTCAGCCG	105348415	Toledo-Silva et al., 2008
CgHem 017-F-17	**	F: GACGATTGGCTTGTGGAG R: ATTGTCCTCTTGTCTCACT	BQ426796.1	Gagnaire et al., 2007

CgHem 027-D-20	**	F: TGTCAGTGGAAACCCCGAGTA R: CACGATTCACCATTGCCG	BQ427105. 1	Gagnaire et al., 2007
CgBTG1	**	F: GCTGTAGACTTCCTCGCAAAC R: CCAAACAAAGGCAGCGGC	NM_00130 8892.1	Liu et al., 2017
RLR (RIG- I-like receptor)	**	AAGCATCCATACAATCAAATAAT GTTGGAGTCGGTAAGGCG	KY630188. 1	Zhang et al., 2014
TNF	*	GGTTCTGCCGTCATTTACGA CACATTCAGTCTCCTCTTG	XM_03444 8714.1	Huang et al., 2017

*Gene não foi expresso **Valor muito baixo de eficiência, logo não foi utilizado

3.4.3 Confirmação da presença de *Amyloodinium ocellatum* nas amostras por PCR

A extração de ADN genómico foi realizada utilizando o FastDNA™ Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) e seguiu-se o protocolo indicado pelo fabricante (Anexo E). A homogeneização dos tecidos, brânquias e glândula digestiva separadamente, foi efetuada no TissueLyzer II da QIAGEN durante 40 segundos a uma frequência de 30 rotações/segundo. Houve necessidade de repetir o passo da homogeneização, pois verificou-se que ainda existia tecido íntegro nos tubos. Após o processo de extração fez-se a quantificação da concentração da amostra de ADN utilizando o espectrofotómetro (DeNovix DS-11 FX). A concentração de ADN no tecido da brânquia controlo foi de 93,900 ng/nL, o rácio 260/230 foi 1,752 e o rácio de 260/280 foi de 1,982, a concentração no tecido da brânquia infetada foi de 77,305 ng/nL, o rácio 260/230 foi -3,441 e o rácio 260/280 foi de 1,982. A concentração de ADN no tecido da glândula digestiva controlo foi de 28,247 ng/nL, o rácio 260/230 foi -1,049 e o rácio de 260/280 foi de 2,258, a concentração no tecido da glândula infetada foi de 25,468 ng/nL, o rácio 260/230 foi -1,308 e o rácio de 260/280 foi de 2,439 (Anexo F, Tabela 2).

Foram selecionados os primers descritos em Marques et al. (2019) para prosseguir com o PCR, desta forma temos o par: AOce_Fw1 – (5' TAGATGTTCTGGGCTGCACG 3'), AOce_Rv2 – (5' CCTACGGAAACCTTGTTACGAC 3'), e o par: AOce_Fw2 – (5' GACCTTGCCCGAGAGGG 3'), AOce_Rv1 – (5' CCGCCACAGTTTTTCAGAAGC 3'). O PCR foi iniciado com a preparação de uma MasterMix num microtubo *ependorf* de 1,5ml foram colocados, por cada amostra a testar, 12,5 µl de FastGene® TAQ ReadyMix PCR (NiponGenetics) 0,625 µl do primer Fw e 0,625 µl do primer Rv. Em microtubos *ependorf* de 0,2 ml, foram colocados 13,75 µl de MasterMix (invitrogen), 20 ng de ADN e adicionou-

se H₂O purificada (MiliQ) até perfazer um volume final de 25 µl, em cada tudo. O controle negativo foi efetuado de igual forma à exceção da adição de ADN que foi substituída por H₂O MiliQ. Os tubos foram dispostos num termociclador (Biometra® Personal Cycler) e o programa foi iniciado pela desnaturação do ADN durante 3 min a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de amplificação de 45s a 94 °C, 30s a 55 °C e 35s a 72 °C, finalizando com a extensão com uma temperatura de 72 °C durante 2min. Em seguida fez se um *Nested* PCR com os dois pares de primer (AOce_Fw1 AOce_Rv2 e AOce_Fw2 AOce_Rv1) para aumentar a especificidade da reação. Os produtos de PCR foram corridos, por eletroforese, num gel de agarose de 1,5%, durante 45min a 120 V. De seguida, foram observados numa câmara de fluorescência (Molecular imager® ChemiDoc XRS+, Bio Rad).

3.4.4 Resposta imune

Com as amostras de hemolinfa obtidas foram analisados os seguintes parâmetros: lisozima, atividade das proteases e óxido nítrico.

Para a determinação da concentração da lisozima na hemolinfa das ostras foi usado um protocolo de acordo com Xue et al., (2004). Foi preparada uma solução tampão hidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄ 0,05 M, pH = 6,2) (Sigma Aldrich), e uma suspensão bacteriana de *Micrococcus lysodeikticus* 0,5 mg/mL (Sigma Aldrich). Numa microplaca, foram adicionados 15 µL de cada amostra (em triplicados) e 250 µL da suspensão bacteriana. Assim que colocada a suspensão bacteriana a reação ocorre de imediato, e nesse momento, com a maior brevidade, coloca-se no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA) a ler a uma absorvância de 450 nm, fazendo uma leitura aos 0 e aos 10 minutos. Para preparar a curva padrão utilizou-se um liofilizado de lisozima proveniente de clara de ovo de galinha (Sigma Aldrich, EUA) com o tampão hidrogenofosfato de sódio anteriormente preparado, a qual foi diluída em série (Passos et al., 2021). Os valores da lisozima em cada uma das amostras, foram calculados usando a fórmula da curva padrão ($y=0,0053x-0,016$ com $R^2= 0,9907$), e são expressos em µg/mL.

A determinação da concentração de óxido nítrico na hemolinfa das ostras foi calculada de acordo com Tafalla et al., (2003). Numa microplaca foram colocados um total de 25 µL de plasma, 100 µL de solução de 1% de sulfanilamida (Alfa Aesar) (C₆H₈N₂O₂S, M= 172,2 g/mol) em ácido fosfórico (Fluka) (H₃PO₄, M=98 g/mol) a 2,5% e 100 µL de solução de N-naftiletilenodiamina (SIGMA) com uma concentração de 0,1M (C₁₂H₁₄N₂·2HCl, M= 259,17 g/mol) em ácido fosfórico a 2,5% (em duplicados) e, após uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram lidas a 540nm num leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA). A concentração de nitrito (µMol mL⁻¹) nas

amostras foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2 , $M=69 \text{ g/mol}$).

A atividade das proteases foi quantificada na hemolinfa das ostras, medindo o nível de tripsina não inibida de acordo com Machado et al. (2015). Para esta análise, 10 μl de hemolinfa, 100 μl de uma solução salina de tampão fosfato (PBS) (13,9 mg/ml, pH 7,0) e 125 μl de azocaseína (SIGMA) (20 mg/ml em NaHCO_3 , pH 8,3) foram adicionados e incubados por 24 h, à temperatura ambiente (22°C) num agitador (Stuart see-saw rocker SSL4). A reação foi interrompida com a adição de 250 μl de ácido tricloroacético (TCA) (SIGMA) (100 mg/ml) e posteriormente incubada por 30 min à temperatura ambiente (22°C). A mistura foi centrifugada (10.000 x g por 5 min) (Eppendorf, 5810R). Transferiu-se 100 μl de sobrenadante e adicionados 100 μl de NaOH (40 mg/ml), numa microplaca. Finalmente, as amostras foram lidas em duplicado a 450 nm num leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA). A percentagem de tripsina não inibida foi calculada por comparação com o valor da amostra de referência, e vem expressa em $\mu\text{g/ml}$.

3.5 Ensaio de viabilidade dos dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* após filtração pelas ostras

Para este ensaio foram utilizadas as ostras provenientes do ensaio de infeção das ostras com dinósporos de *A. ocellatum*, anteriormente referido. Os peixes da espécie *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), foram provenientes de tanques no interior das instalações onde existe um grande controlo na qualidade da água e nunca existiu infeção por *A. ocellatum*.

Às 3h do dia 0, foram colocadas 4 ostras de cada triplicado do grupo infetado em três tanques com 2 peixes da espécie *S. aurata*, dourada. As ostras tinham um peso médio de $331,2 \pm 55,6\text{g}$ e os peixes tinham um peso médio de $126,3 \pm 15,5\text{g}$. As ostras foram alimentadas uma vez por dia com um mix de microalgas, *P. tricornutum* com concentração $8,89 \times 10^5 \text{ cel/ml}$ e *Skeletonema costatum*, de concentração $5,23 \times 10^4 \text{ cel/ml}$, durante 4 dias.

Os peixes ao fim de 96h foram sacrificados, medidos e pesados e observadas as brânquias para verificar a presença ou ausência do parasita. As ostras também foram medidas e pesadas para efeitos de caracterização da amostra.

Após observação das brânquias dos peixes ao microscópio ótico (Leica ICC50W), verificou-se que estas continham o parasita *A. ocellatum*. Para cada peixe foram

observados 2 arcos branquiais e fez-se a contagem do número de trofontes existente em cada arco branquial.

3.6 Análise Estatística

Foram analisadas estatisticamente as análises histológicas, expressão genética e parâmetros de resposta imune. Os resultados são apresentados na forma de média com o respectivo desvio padrão (DP).

Os dados de cada parâmetro foram testados para diferenças estatísticas significativas, usando uma análise de variância unidirecional (ANOVA), com tempo de amostragem como fator, seguido por testes de comparação múltipla - teste de Tukey, sempre que os critérios de homogeneidade e normalidade foram atendidas. Nos casos em que os dados não atendiam aos pressupostos de homogeneidade e normalidade, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. A significância estatística foi testada em $p < 0,05$, e toda a análise estatística foi realizada usando o software SPSS da IBM (versão 28.0, EUA).

4. Resultados

4.1 Resultados Pré ensaio – Afinação de técnicas de infeção de ostras

Verificou-se que a ostra demorou 2 horas a filtrar todo o conteúdo presente na água (Figura 14) e demorou 3 horas até aparecerem as primeiras fezes, desde o início da alimentação (Tabela 3).

Tabela 3: Observações relativas ao pré ensaio com ostras da espécie *Magallana gigas* alimentadas com as microalgas *Tetraselmis rubens* e *Isochrysis galbana*.

TEMPO (H)	OBSERVAÇÕES
0	Adição da microalga; água com cor verde
1	Água com menos coloração
2	Água transparente
3	1 ^{as} fezes identificadas
4	Fezes
5	Fezes
6	Fezes

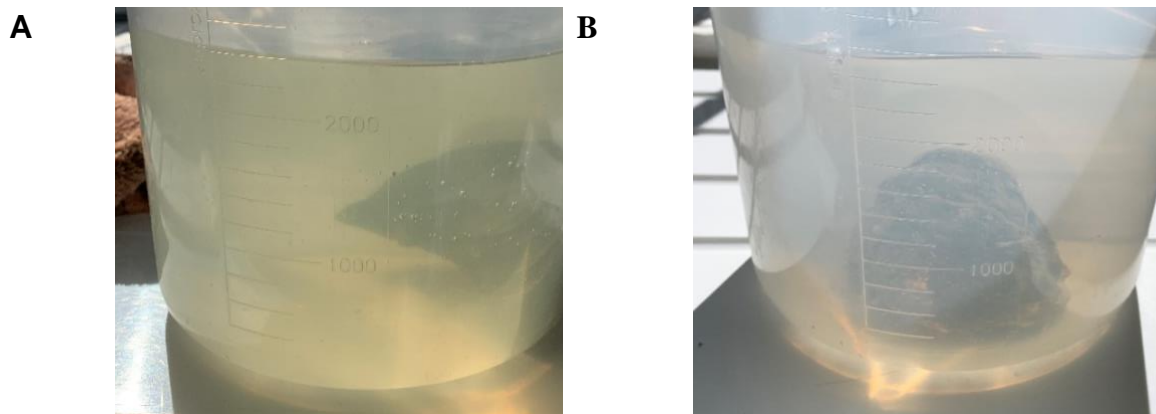


Figura 14: Figura ilustrativa da variação da turbidez da água; A: ostra (*Magallana gigas*) alimentada com *Tetraselmis rubens* às 0h; B: ostra (*Magallana gigas*) às 2h.

Relativamente à observação das fezes verificou-se que a ostra não digeriu a microalga *T. rubens*. Pela observação das fezes verificou-se que esta microalga apresenta um formato arredondado ou em esfera semelhante a uma fase do ciclo de vida do parasita *A. ocellatum* (dinósporos) (Figura 15).

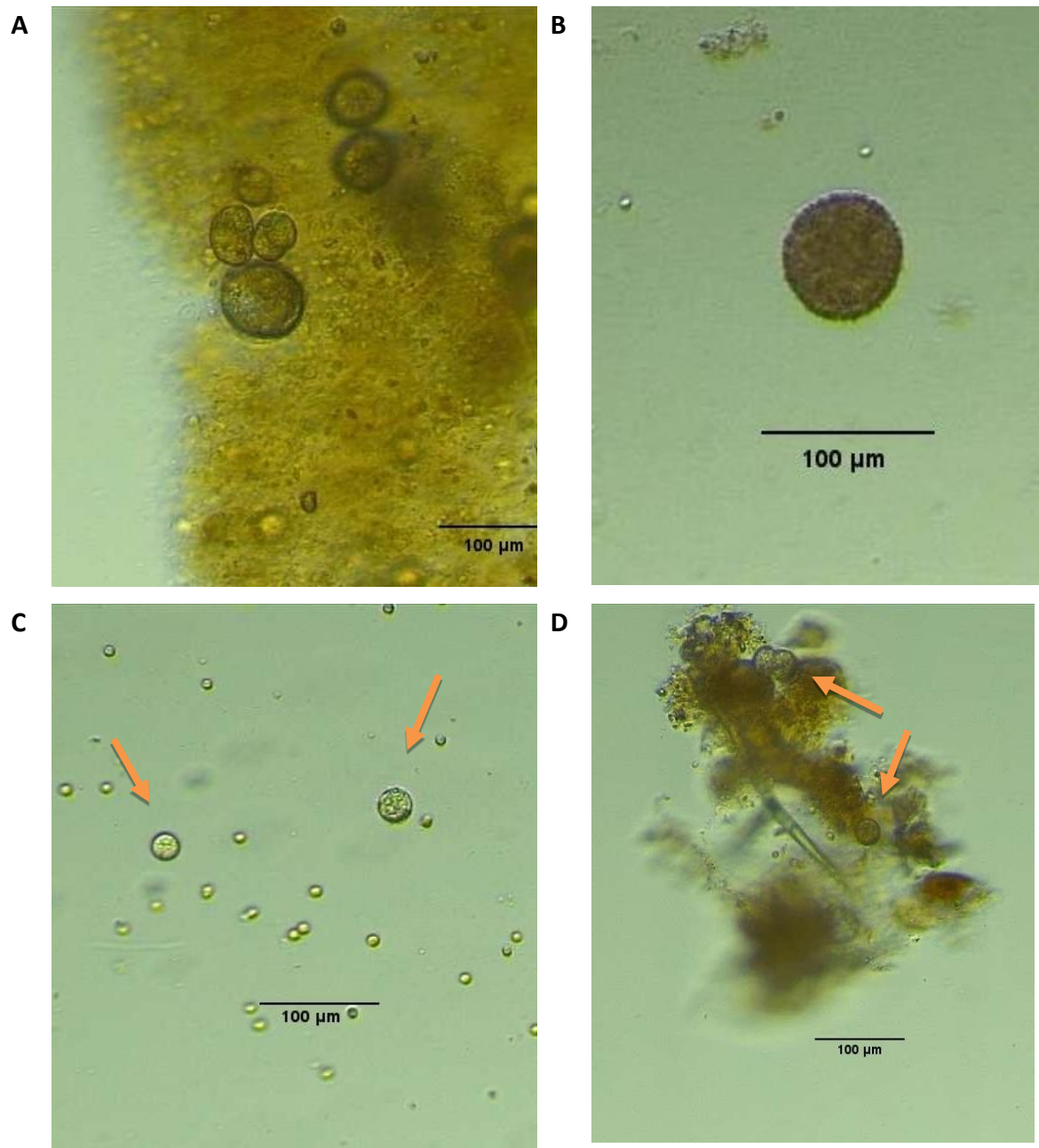


Figura 15: Fotografias tiradas ao microscópio ótico, das fezes de ostra (*Magallana gigas*) alimentadas com *Tetraselmis rubens* A: Tomontes de *Amyloodinium ocellatum* envolvidos nas fezes (200x); B: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* observado (200x); C: Dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* (indicados com setas laranjas) em fezes com microalga *Tetraselmis rubens* (100x); D: Tomontes de *Amyloodinium ocellatum* (indicados com setas laranjas) envolvidos nas fezes de ostra (100x). Barra de escala: 100µm.

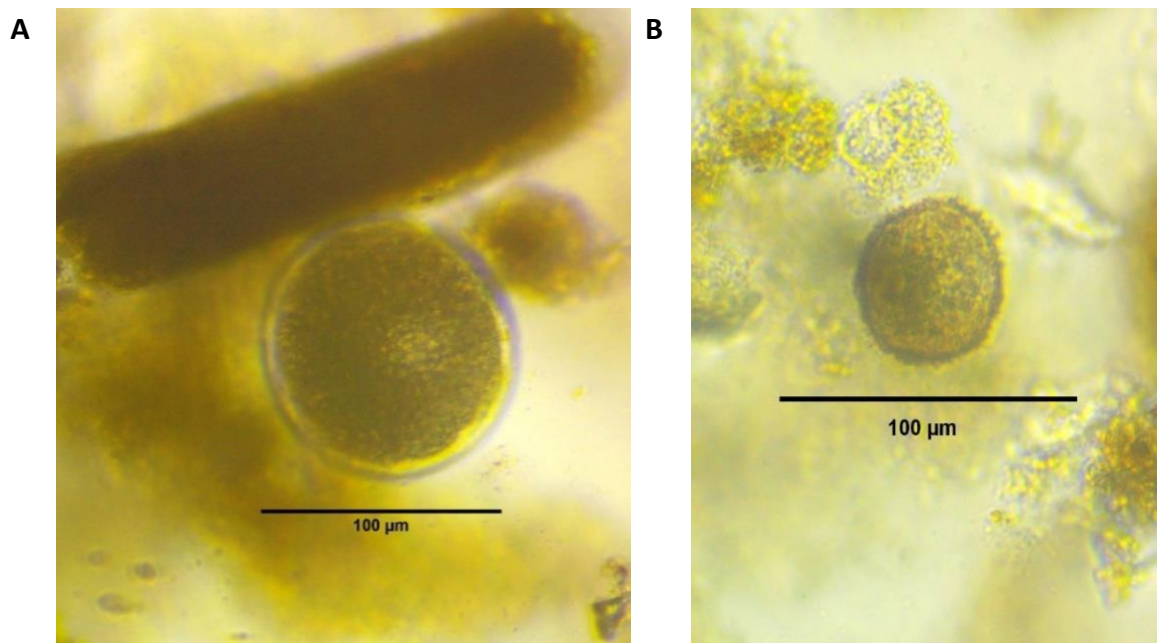
Nas incubações feitas na placa de 96 poços com as fezes da ostra, verificou-se que estas continham muitos microrganismos que apresentavam movimento, para além dos dinósporos de *A. ocellatum*, o que dificultou a visualização do organismo nas diferentes

fases do seu ciclo de vida. Para além disso continha demasiados detritos dificultando, ainda mais, a visualização de resultados. Ao terceiro dia de observação, a quantidade de microrganismos que não eram de interesse aumentou piorando a observação. Contudo, os tomontes existentes no primeiro dia e ao terceiro dia permaneceram iguais ou desfizeram-se em alguns casos (Figura 15).

Na figura 15 A e B, podem observar-se tomontes, que surgiram nas fezes no primeiro dia de observação e permaneceram no mesmo estado durante os vários dias de observação. Na figura 15 C e D temos a observação de dinósporos imóveis nas fezes.

As ostras (4 e 5) que foram alimentadas com *I. galbana*, observou-se o mesmo que na ostra alimentada com *T. rubens* (ostra 6) (Tabela 3) em relação ao tempo de filtração do alimento colocado na água. As fezes destas ostras foram observadas, permanecendo a dificuldade de visualização e distinção entre a microalga e o parasita *A. ocellatum*.

Na figura 16 podem observar-se alguns dos tomontes, que apareceram nas fezes das ostras 4 e 5. Mais uma vez e em concordância com o resultado obtido na observação das fezes da ostra 6 (Tabela 3), os tomontes observados nas fezes da ostra 4 e 5 não evoluíram ao longo dos dias de observação.



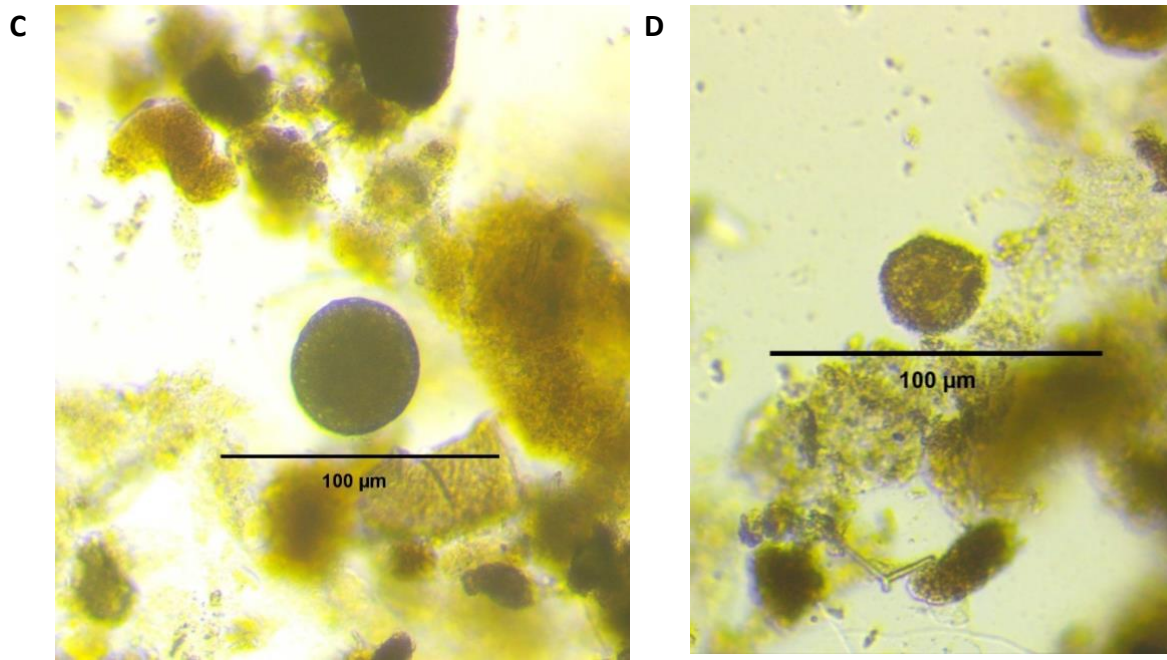
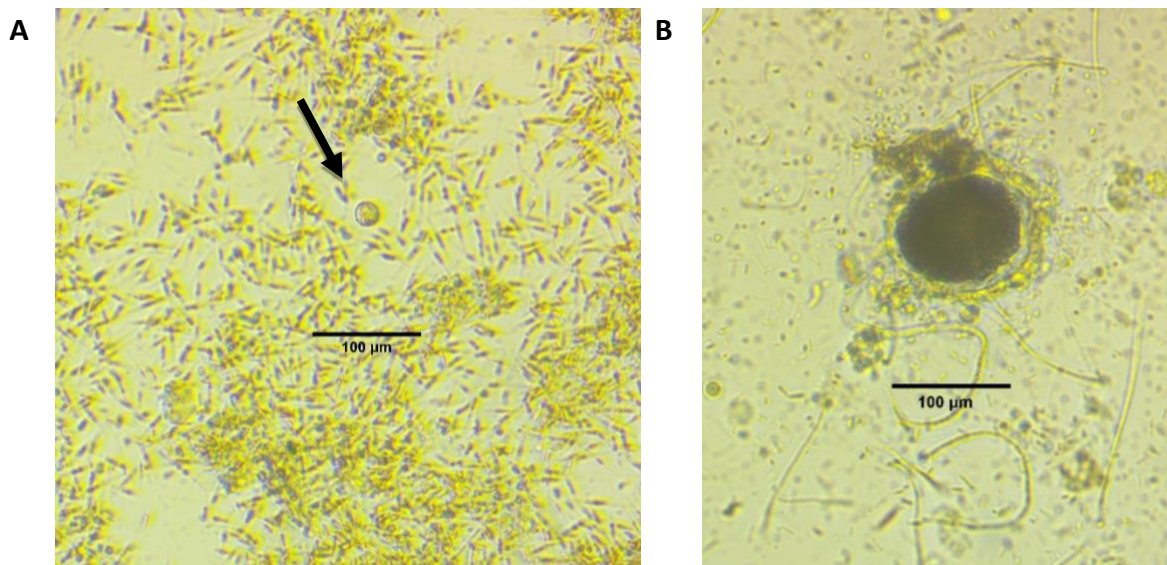


Figura 16: Fotografias tiradas ao microscópio ótico das fezes incubadas numa placa de 96 poços, da ostra 4 e 5 da espécie *Magallana gigas*, alimentadas com *Isochrysis galbana*; A: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes da ostra 4 (200x); B: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes da ostra 4 (200x); C: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes da ostra 5 (100x); D: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes da ostra 5 (100x). Barra de escala: 100µm.

As fezes recolhidas das ostras 2 e 3, que foram alimentadas com *P. tricornutum*, permitiram melhor observação do parasita *A. ocellatum*. Na figura 17, podem observar-se alguns dos tomontes e dinósporos de *A. ocellatum* que apareceram nas fezes.



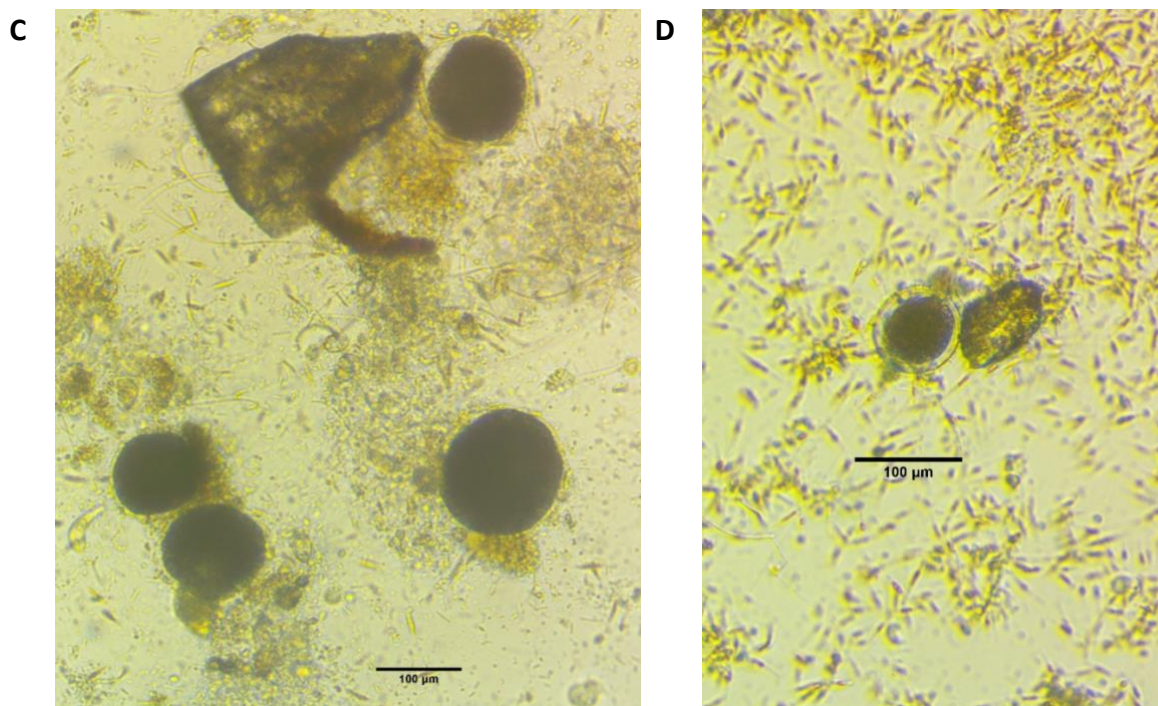


Figura 17: Fotografias tiradas ao microscópio ótico das fezes incubadas numa placa de 96 poços, das ostras 2 e 3 da espécie *Magallana gigas*, alimentadas com a microalga *Phaeodactylum tricornutum*; A: Dinósporo de *Amyloodinium ocellatum* (seta preta) (100x); B: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes (200x); C: Tomontes de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes (200x); D: Tomonte de *Amyloodinium ocellatum* envolvido nas fezes (200x). Barra de escala: 100µm.

Na figura 18 é apresentada uma fotografia das fezes da ostra, a ostra controlo negativo, observando-se apenas a presença da microalga *P. tricornutum*, não sendo detetado a presença do parasita *A. ocellatum*.

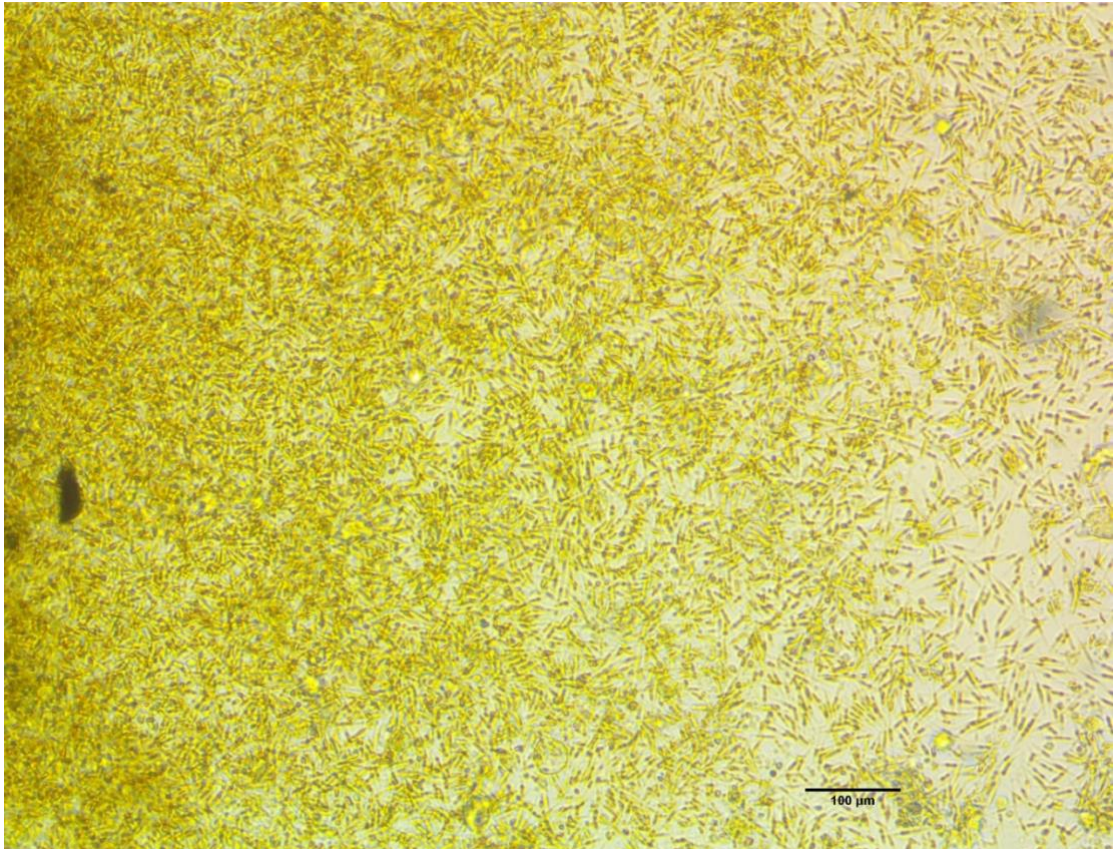


Figura 18: Fotografia tiradas ao microscópio ótico das fezes incubadas numa placa de 96 poços, da ostra do controlo negativo da espécie *Magallana gigas*, alimentada com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* (100x); Barra de escala: 100μm.

4.2 Resultados da viabilidade dos dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* após ingestão pelas ostras

Na incubação das fezes das ostras ao longo dos dias, não se verificou a presença do parasita *A. ocellatum* nas fezes das ostras quando observadas ao microscópio ótico, nem no grupo controlo, nem no grupo infetado. Verificou-se sim a presença de pequenos crustáceos marinhos e protozoários.

4.2.1 Análise Histológica

Brânquias

A nível das brânquias verificou-se hiperplasia epitelial em ambos os tratamentos, controlo e infetado, e nos vários momentos de amostragem, 0h, 96h, 168h, existindo diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 96h (p-value = 0,046) (Figura 19).

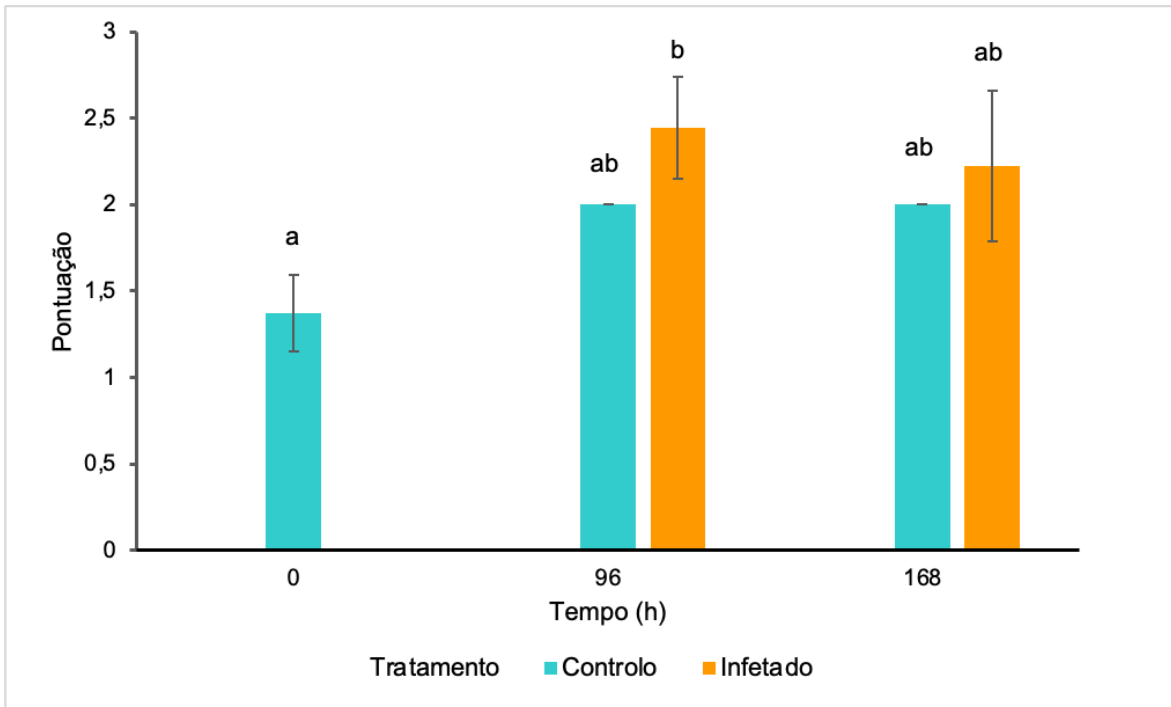


Figura 19: Gráfico de barras da média das pontuações da lesão hiperplasia epitelial nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, ao longo do tempo e por tratamento, grupo controlo e grupo infetado. ANOVA de um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Verificou-se ainda hipertrofia epitelial, com diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value}=0,006$), e o grupo controlo às 168h (7 dias) e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value}=0,011$) (Figura 20).

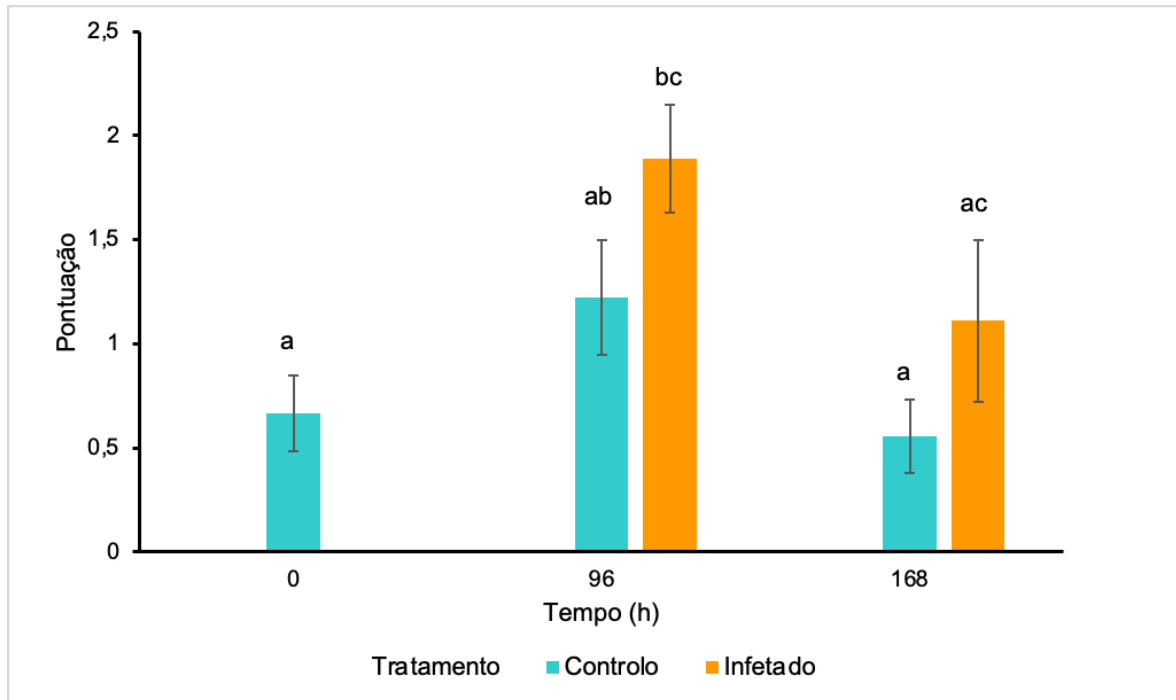


Figura 20: Gráfico de barras da média das pontuações da lesão hipertrofia epitelial nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA de um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Verificaram-se, também, ruturas no epitélio branquial (Figura 21) onde se registaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value}=0,003$), e entre o grupo controlo às 168h e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value}=0,028$).

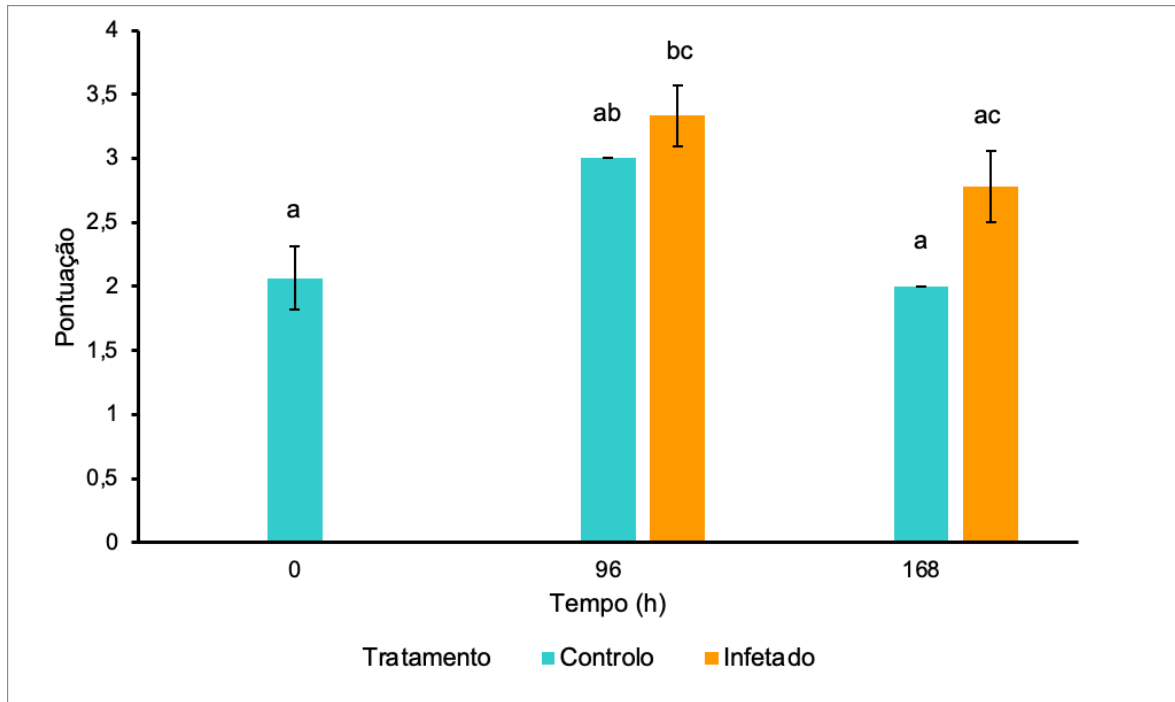


Figura 21: Gráfico de barras da média das pontuações da lesão ratura do epitélio nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Observou-se ainda infiltração de hemócitos (Figura 22), onde se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo infetado às 96h e o grupo infetado às 168h (7 dias) ($p\text{-value} = 0,024$).

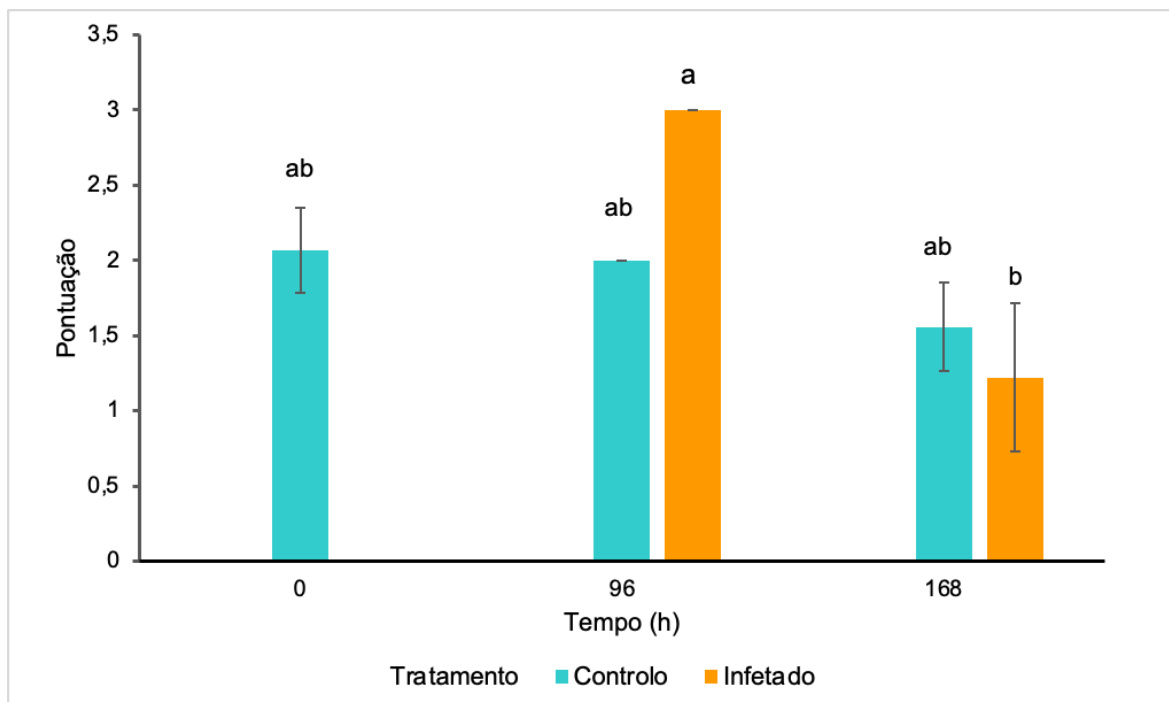


Figura 22: Gráfico de barras da média das pontuações da infiltração de hemócitos nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Relativamente à necrose (Figura 23), onde se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value} = 0,012$), entre o controlo às 168h (7 dias) e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value} = 0,004$), e entre o grupo infetado às 96h e o grupo controlo às 96h ($p\text{-value} = 0,002$).

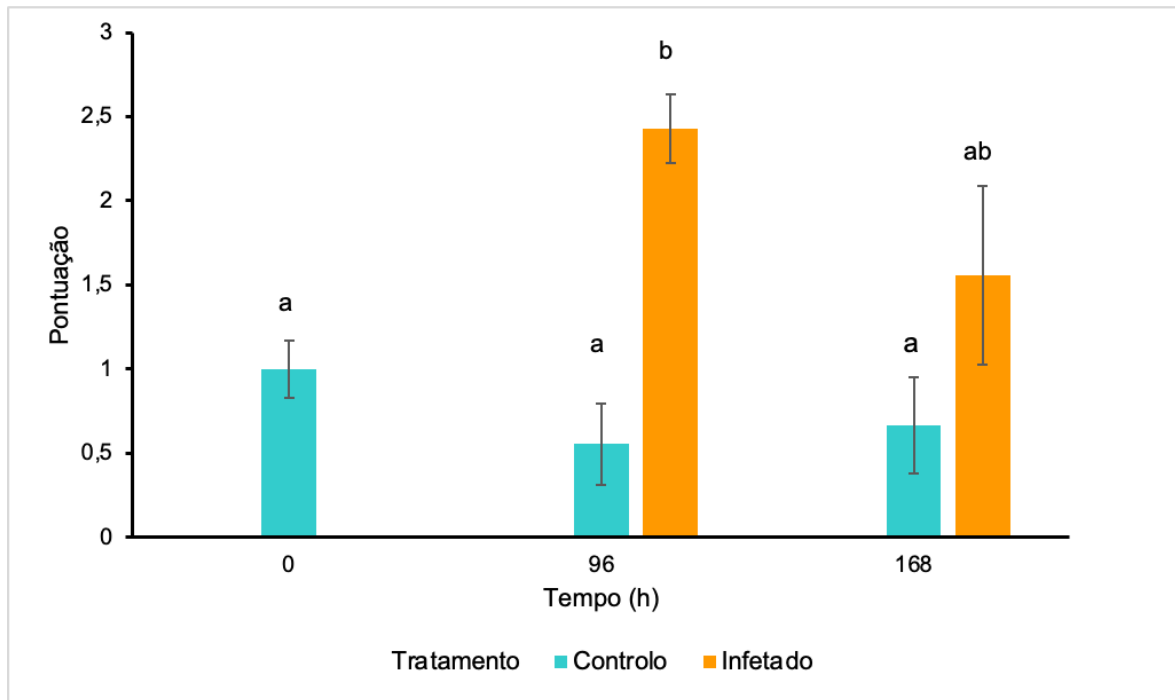


Figura 23: Gráfico de barras da média das pontuações de necrose nas brânquias de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

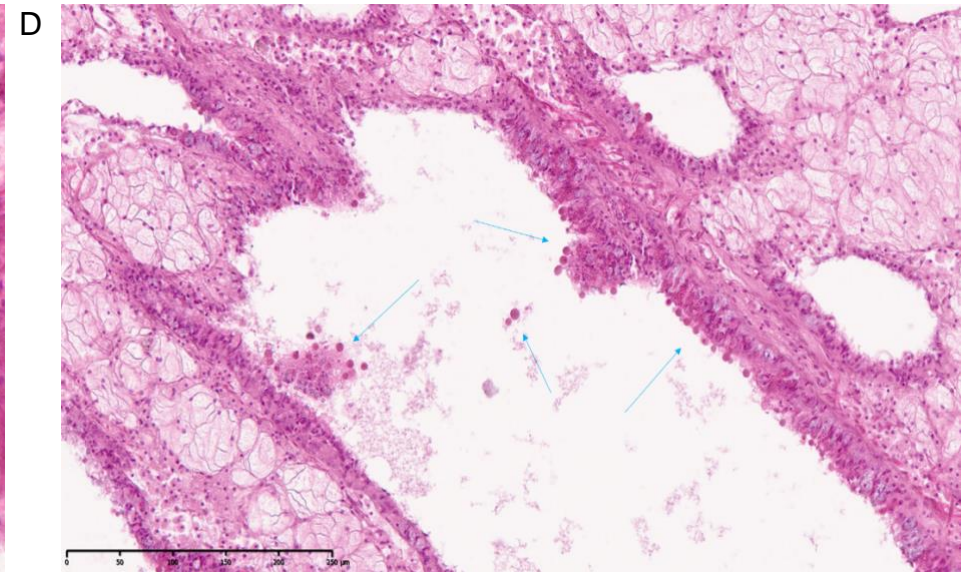
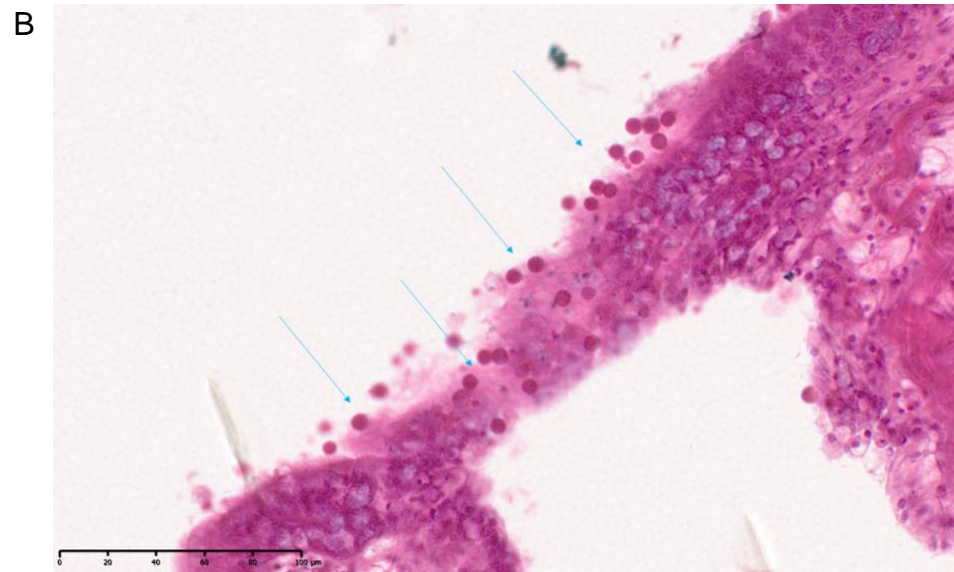
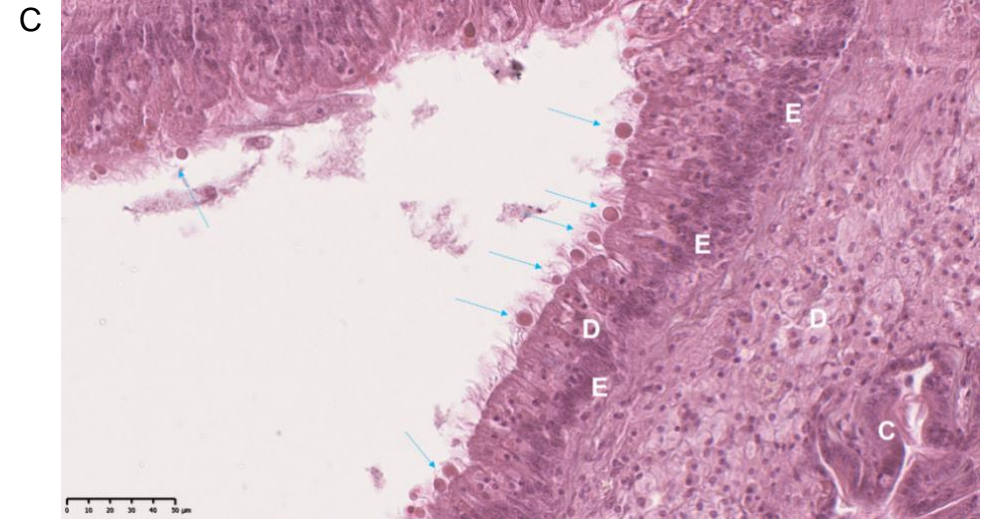
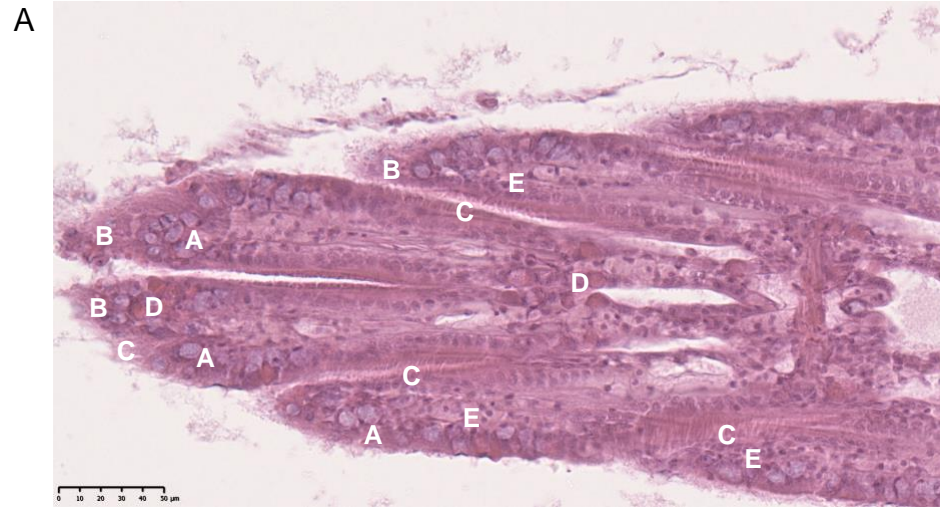


Figura 24: Cortes histológicos de brânquias de ostras da espécie *Magallana gigas*, observados ao microscópio ótico com uma ampliação total de: A: 40x; B:40x; C:40x; D:20x; Legenda: A -: Hiperplasia epitelial; B – Hipertrofia Epitelial; C - Rutura do epitélio; D - Inflamação de hemócitos; E – Necrose; Setas azuis: *Amyloodinium ocellatum*.

Glândula digestiva

A nível da glândula digestiva verificou-se infiltração dos hemócitos ou diapedese dos mesmos em ambos os tratamentos, controlo e infetado, e nos vários momentos de amostragem, 0h, 96h, 168h. Como se pode observar na Figura 25, houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo às 0h e o grupo controlo às 96h (p -value < 0,001), entre o grupo controlo às 0h e o grupo controlo às 168h (7 dias) (p -value < 0,001), entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 168h (7 dias) (p -value < 0,001), entre o grupo controlo às 168h e o grupo infetado às 96h (p -value < 0,001), entre o grupo controlo às 96h e o grupo infetado às 96h (p -value = 0,001), e entre o grupo infetado às 96h e o grupo infetado às 168h (7 dias) (p -value = 0,001).

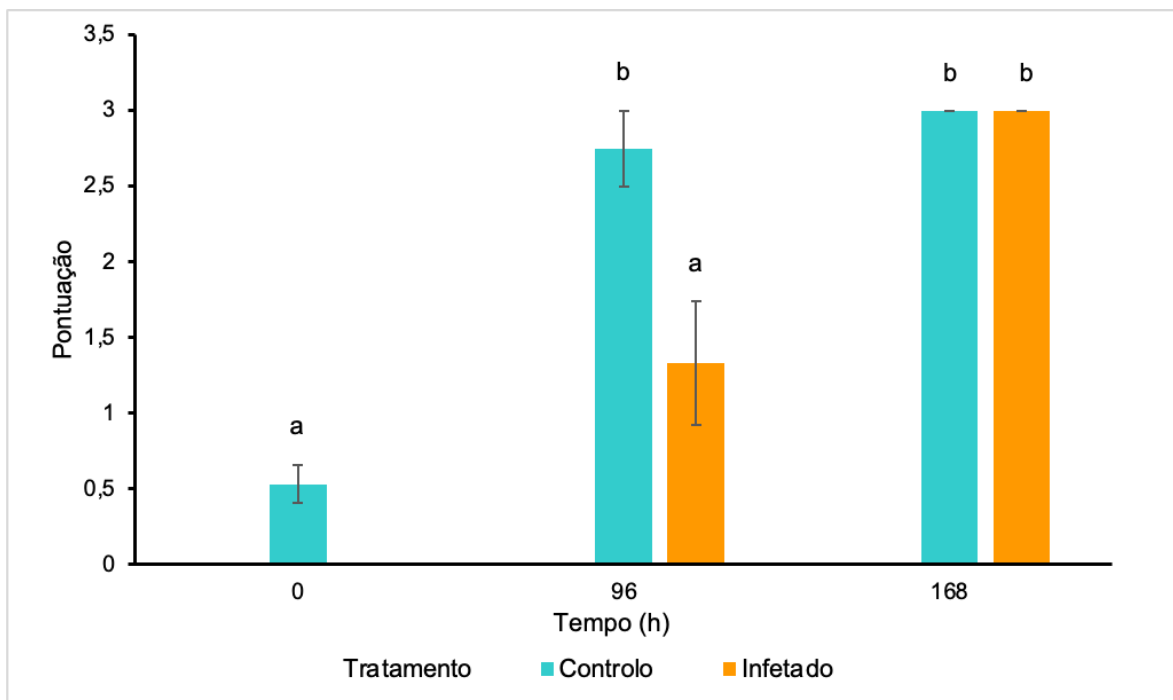


Figura 25: Gráfico de barras da média das pontuações da infiltração e/ou diapedese dos hemócitos na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Também se verificou enterite na glândula digestiva (Figura 26), onde se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 96h (p -value = 0,003), entre o grupo controlo às 0h e o grupo controlo às 96h (p -

value=0,001), entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 168h (7 dias) (p-value<0,001), e entre o grupo controlo às 0h e o grupo controlo às 168h (7 dias) (p-value<0,001).

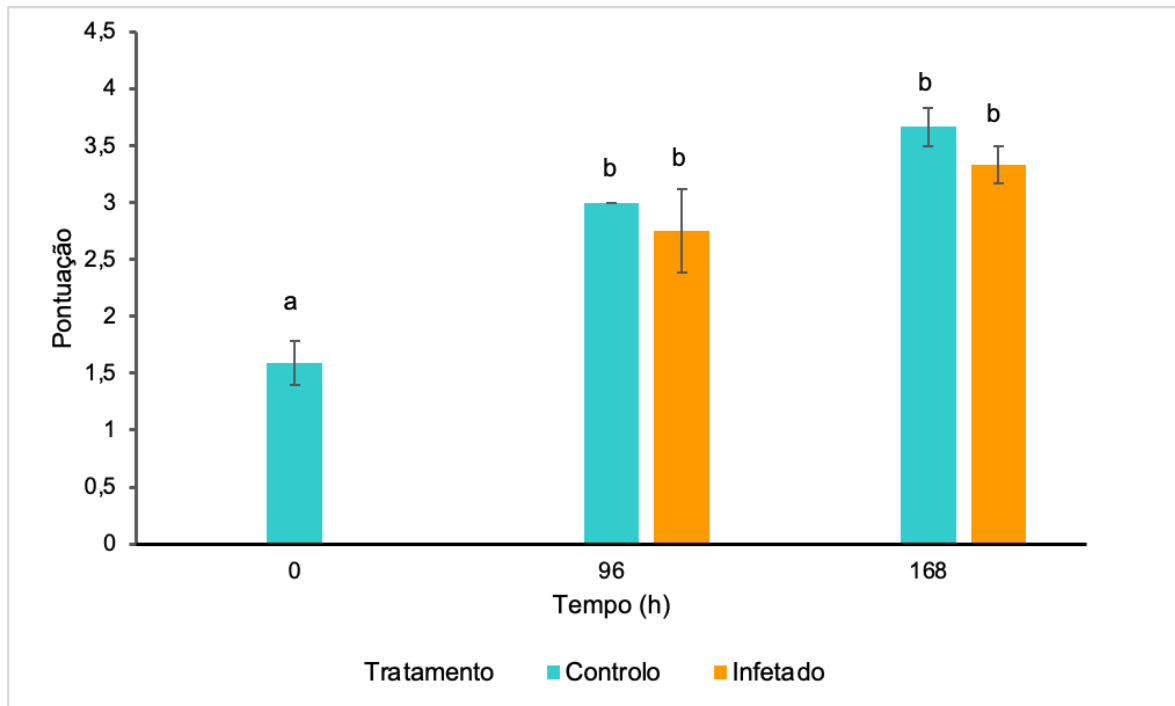


Figura 26: Gráfico de barras da média das pontuações de enterites na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos (p<0,05).

Em relação às lesões de fusões lamelares (Figura 27) identificadas nas amostras de glândula digestiva das ostras, existem diferenças estatisticamente significativas, entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 96h (p-value=0,024).

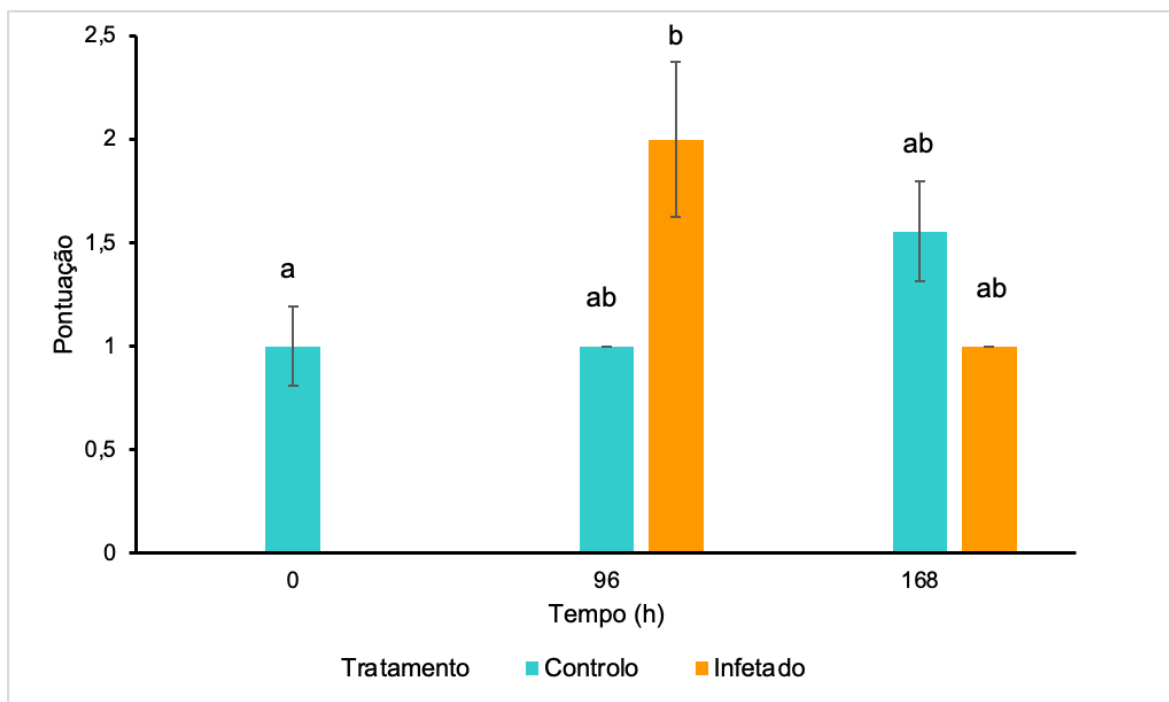


Figura 27: Gráfico de barras da média das pontuações de fusões lamelares na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Já nas regressões tubulares (Figura 28) encontradas nas glândulas digestivas observadas houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value} < 0,001$), e entre o grupo controlo às 0h e o grupo controlo às 168h (7 dias) ($p\text{-value} < 0,001$).

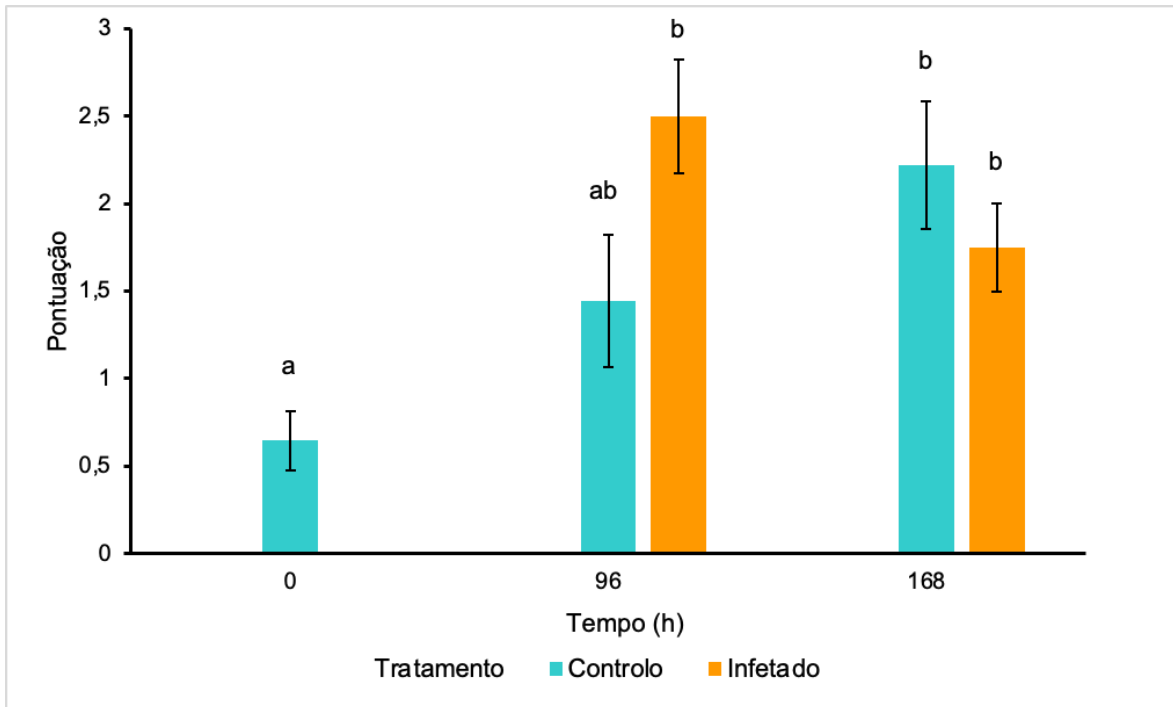


Figura 28: Gráfico de barras da média das pontuações de regressões tubulares na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Verificou-se por fim alguma necrose (Figura 29), onde se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo às 0h e o grupo controlo às 96h ($p\text{-value} < 0,001$), entre o grupo controlo às 0h e o grupo controlo às 168h (7 dias) ($p\text{-value} < 0,001$), entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 168h (7 dias) ($p\text{-value} < 0,001$), entre o grupo controlo às 96h e o grupo controlo às 168h (7 dias) ($p\text{-value} = 0,042$), entre o grupo controlo às 96h e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value} < 0,001$), entre o grupo controlo às 96h e o grupo infetado às 168h (7 dias) ($p\text{-value} = 0,002$), entre o grupo infetado às 96h e o grupo infetado às 168h (7 dias) ($p\text{-value} < 0,001$), e entre o grupo infetado às 96h e o grupo controlo às 168h (7 dias) ($p\text{-value} < 0,001$).

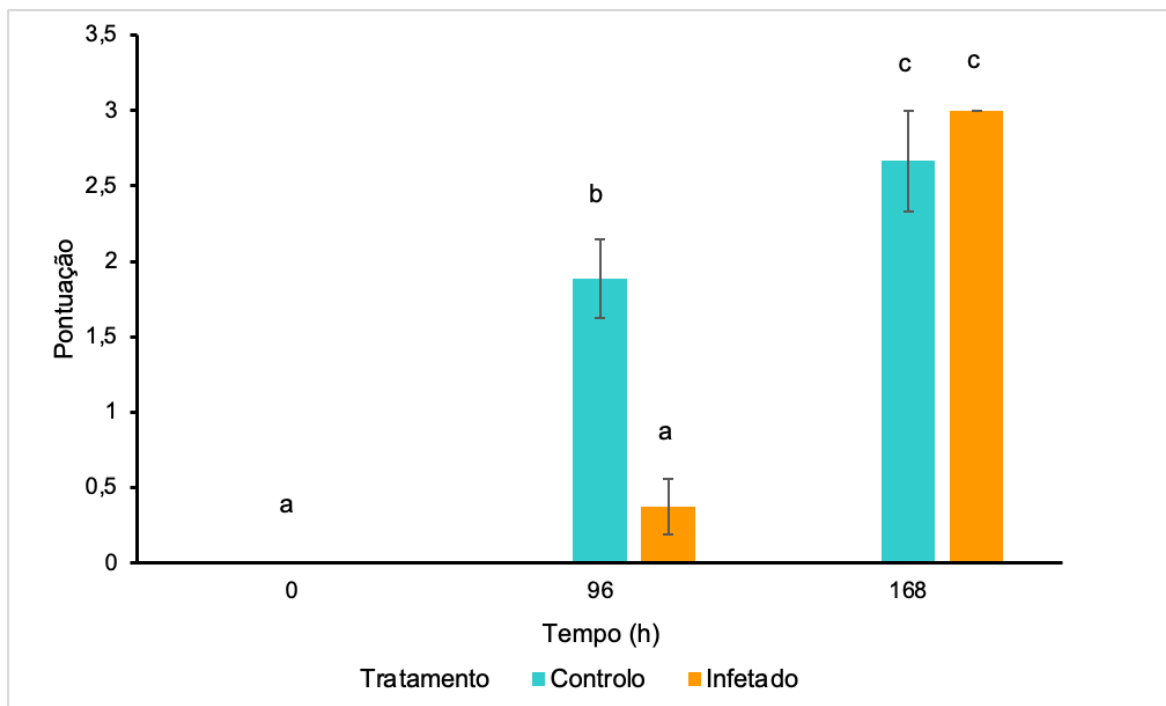


Figura 29: Gráfico de barras da média das pontuações de necrose na glândula digestiva de indivíduos da espécie *Magallana gigas*, por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar diferenças entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

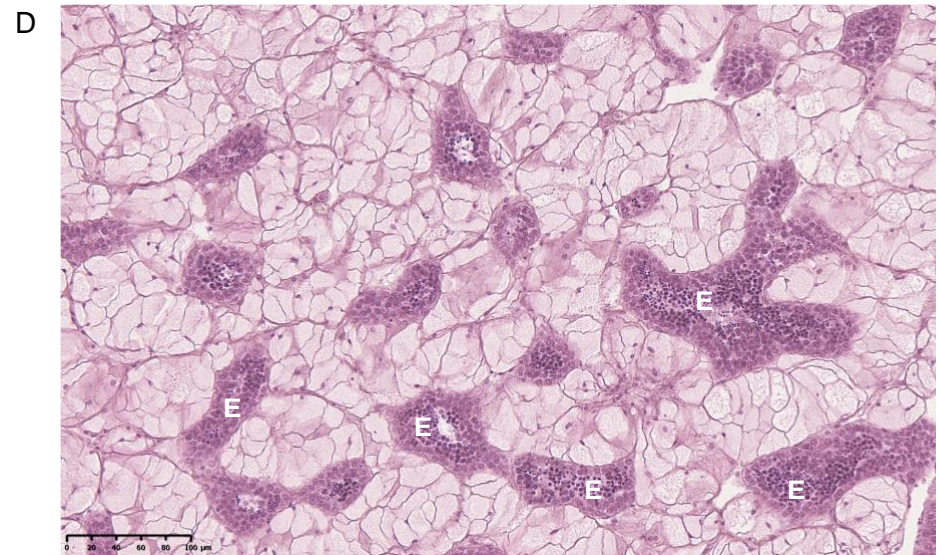
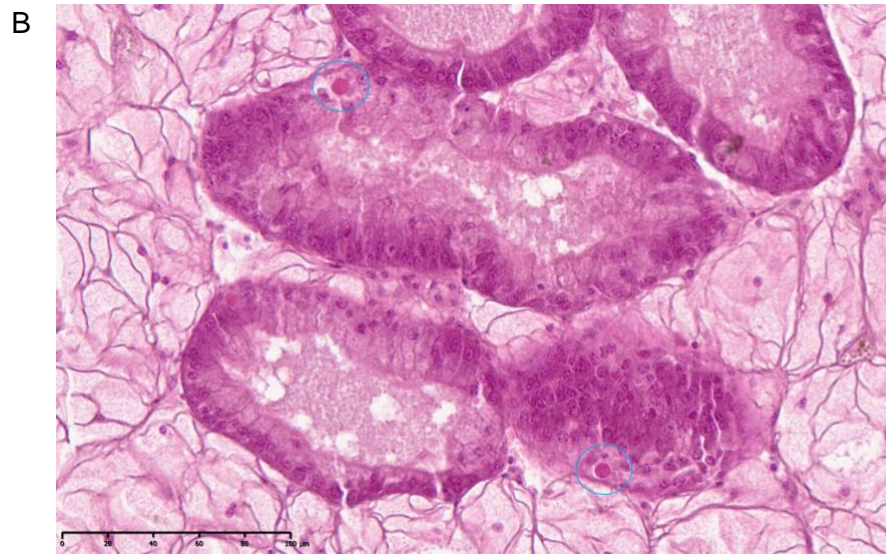
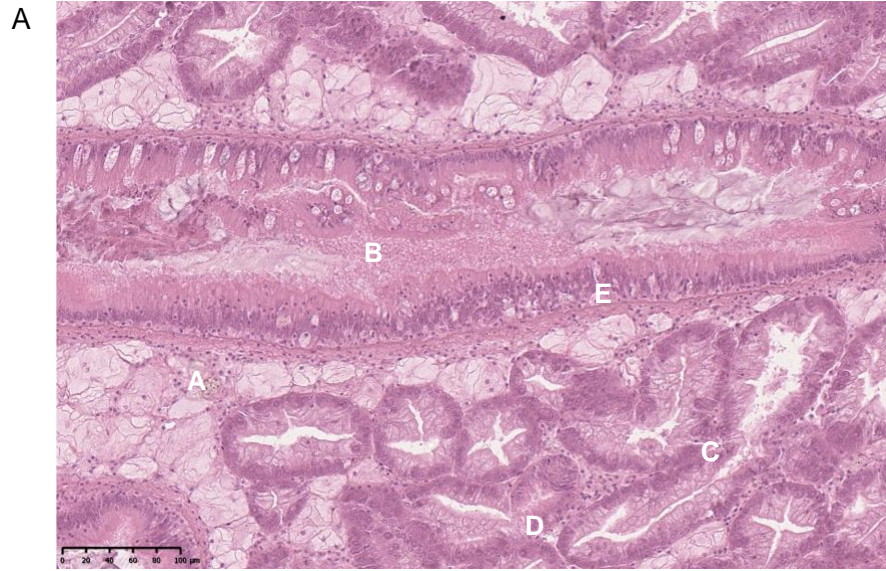


Figura 30: Cortes histológicos de glândula digestiva de ostras da espécie *Magallana gigas*, observados ao microscópio ótico com uma ampliação total de: A: 40x; B:40x; C:40x; D:20x; Legenda: A -: Hemócitos (Infiltração/diapedese); B – Enterite; C – Fusão Lamelar; D – Regressão tubular; E – Necrose; Círculos azuis: *Amyloodinium ocellatum*.

Na tabela 4 estão apresentados os valores de área, perímetro e circularidade do lúmen tubular das ostras da espécie *M. gigas* nos respectivos momentos de amostragem em forma de média e desvio padrão. No grupo controlo pode observar-se uma diminuição no valor de área ao longo do tempo, que o valor menor de perímetro é apresentado no tempo 96h e o maior valor às 0h, e a circularidade é semelhante em todos os momentos variando de $0,2\pm 0,1$ a $0,3\pm 0,1$. No grupo infetado, observou-se uma variação entre $594,8\pm 157,2$ de valor mínimo às 168h e valor máximo $677,6\pm 223,5$ às 96h relativamente ao valor de área, no perímetro observou-se uma variação entre $183,5\pm 27,7$ de valor mínimo às 168h e valor máximo $218,8\pm 57,0$ às 96h, já na circularidade não existiu variações apresentando um valor de $0,2\pm 0,1$ ao longo do tempo.

Após feita a análise estatística não existiram diferenças estatisticamente significativas entre grupos, em nenhum dos valores calculados em nenhum dos momentos de amostragem.

Tabela 4: Caracterização histológica do lúmen tubular das ostras da espécie *Magallana gigas* através da média e desvio padrão dos valores da área, perímetro e circularidade, nos respetivos momentos de amostragem (n=20).

Tempo	Área (μm^2)		Perímetro (μm)		Circularidade	
	Controlo	Infetado	Controlo	Infetado	Controlo	Infetado
T0	666,1 \pm 378,5		203,1 \pm 39,0		0,2 \pm 0,1	
T96	624,6 \pm 269,3	677,6 \pm 223,5	170,3 \pm 28,9	218,8 \pm 57,0	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1
T168	601,5 \pm 251,0	594,8 \pm 157,2	196,0 \pm 56,2	183,5 \pm 27,7	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1

Na tabela 5 estão apresentados o número médio de trofontes observados nas brânquias e glândula digestiva das ostras da espécie *M. gigas* nos respetivos momentos de amostragem em forma de média e desvio padrão. Após feita a análise estatística existiram diferenças estatisticamente significativas no tecido branquial, entre o controlo T0 e o infetado T96 (p-value<0,001), entre o controlo T168 e infetado T96 (p-value<0,001), entre o infetado T96 e o infetado T168 (p-value<0,001), e entre o infetado T168 e o controlo T96 (p-value=0,007).

Já no tecido da glândula digestiva existiu apenas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo T0 e o grupo infetado T168 (p-value=0,004), e o grupo controlo T0 e o grupo controlo T96 (p-value=0,004).

Tabela 5: Média e desvio padrão do número médio de trofontes de *Amyloodinium ocellatum* observados nas brânquias e glândula digestiva das ostras (*Magallana gigas*) nos respectivos momentos de amostragem no ensaio de infecção das ostras *Magallana gigas* com dinósporos de *Amyloodinium ocellatum*. As letras a,b e c representam as diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos nos vários momentos de amostragem.

Tratamento	Brânquias	Glândula digestiva
Controlo T0	6,6±3,4 ^a	2,9±2,1 ^a
Controlo T96	8,7±5, 5 ^{ac}	0,3±0,5 ^b
Infetado T96	13,8±5, 3 ^c	2,1±2,7 ^a
Controlo T168	5,7±3, 1 ^{ab}	1,3±0,9 ^a
Infetado T168	2,3±1, 6 ^b	0,6±0,9 ^b

4.2.2 Avaliação da expressão genética

Após a extração de RNA, procedeu-se à sua avaliação relativamente à quantidade e qualidade como descrito em cima nos materiais e métodos. Os rácios obtidos através da espectrofotometria com o NanoDrop concedem a quantificação e a pureza de cada amostra. A concentração de RNA no tecido das brânquias variou entre 698,0 ng/μL e 1613,6 ng/μL, com rácio de 260/230 nm entre 1,38 e 1,68 e rácio 260/280 nm entre 2,00 e 2,11. A concentração de RNA no tecido das glândulas variou entre 801,0 ng/μL e 2666,8 ng/μL, com rácio de 260/230 nm entre 1,17 e 1,39 e rácio 260/280 nm entre 1,98 e 2,07 (Anexo F, tabela 1).

Relativamente aos primers escolhidos, quando se fez o cálculo de eficiência, verificou-se que apenas o gene Elongation fator 1 e o gene β-actin tinham eficiências indicadas para continuar com a testagem dos mesmos. Estes dois genes foram escolhidos como os housekeeping. Os genes CgDNMT3-RT (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3) e TNF (Tumor Necrosis Factor) não foram expressos.

Os restantes genes, EsSOD (Extracellular superoxide dismutase), CytochromeP40 (Steroid 17-alpha-hydroxylase), CgHem017-F-17 (SOD-like), CgHem027-D-20, CgBTG1 (TIMP: um inibidor tecidual de metaloproteinases), RLR (recetores do tipo género I retinóico induzíveis por ácido retinóico), quando realizado o RT-PCR demonstraram ter amplificações inespecíficas bem como dímeros de primers, concordando assim com o resultado das eficiências calculadas para estes genes. Assim, não se avançou com esta análise, uma vez que são necessárias várias otimizações antes de se poder avançar com o trabalho.

4.2.3 Confirmação por PCR da presença de *Amyloodinium ocellatum* nas amostras de ostra

Esta etapa do trabalho é extremamente importante, tanto para confirmar que as ostras filtram o *A. ocellatum*, como para confirmação de que os controlos não estariam infetados.

Os produtos de PCR foram corridos, por eletroforese, num gel de agarose a 1,5% (Figura 31), como descrito nos materiais e métodos, obtendo-se um resultado positivo para todas as amostras e o controlo positivo (CP), brânquia controlo (BC), brânquia infetada (BI), glândula controlo (GC), glândula infetada (GI). Apenas o controlo negativo (CN) deu negativo na deteção do *A. ocellatum*.

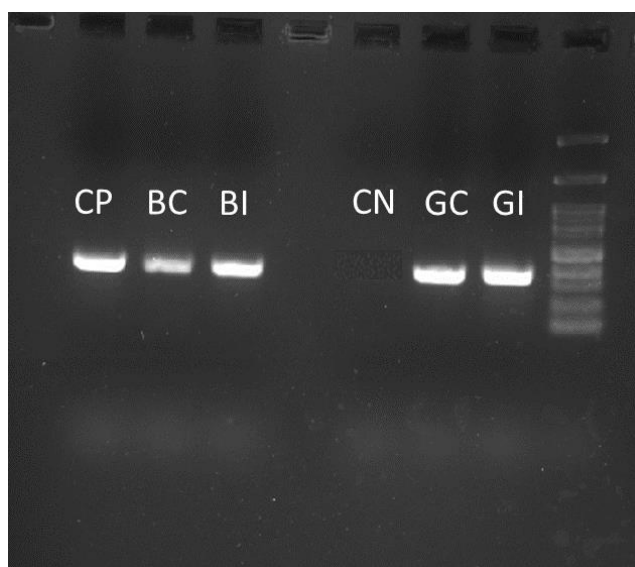


Figura 31: Gel de agarose a 1,5% corrido por eletroforese para a confirmação de *Amyloodinium ocellatum* nas amostras, controlo positivo (CP), brânquia controlo (BC), brânquia infetada (BI), glândula controlo (GC), glândula infetada (GI), controlo negativo (CN).

Depois do resultado obtido no gel de eletroforese da figura 31, as amostras foram para sequenciar para confirmar o resultado do gel. O resultado da sequenciação foi positivo para *A. ocellatum* em todas as amostras como o resultado obtido no gel, confirmando assim a presença de *A. ocellatum* nas amostras.

4.2.4 Resposta imune

Os parâmetros analisados a nível da resposta imune das ostras foram: lisozima, atividade das proteases e óxido nítrico. Cada um destes parâmetros foi analisado

estatisticamente, e os resultados são apresentados em gráficos de barras com o controle e o tratamento nos dois momentos de amostragem com os respectivos desvios padrão.

No que diz respeito à lisozima (Figura 32) observaram-se diferenças significativas entre o grupo controle às 0h com o grupo infetado às 96h ($p\text{-value}<0,001$).

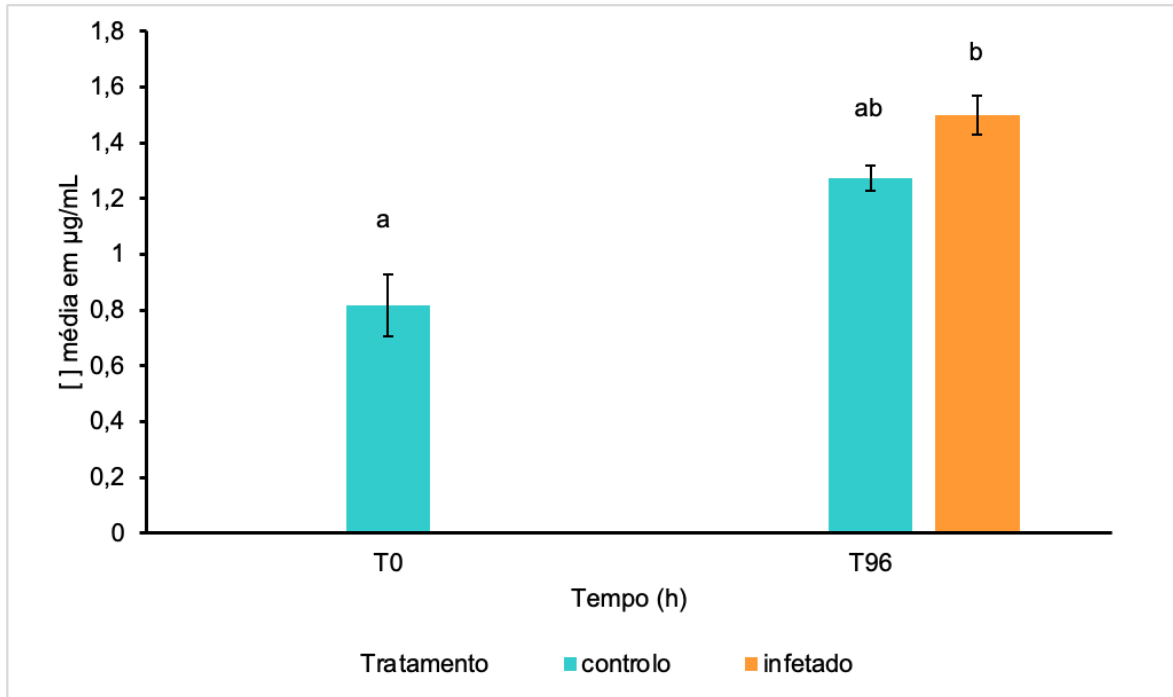


Figura 32: Gráfico de barras da média das concentrações de lisozima em $\mu\text{g/ml}$ por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p<0,05$).

No que diz respeito ao parâmetro da atividade das proteases (Figura 33) não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo nos diferentes momentos de amostragem.

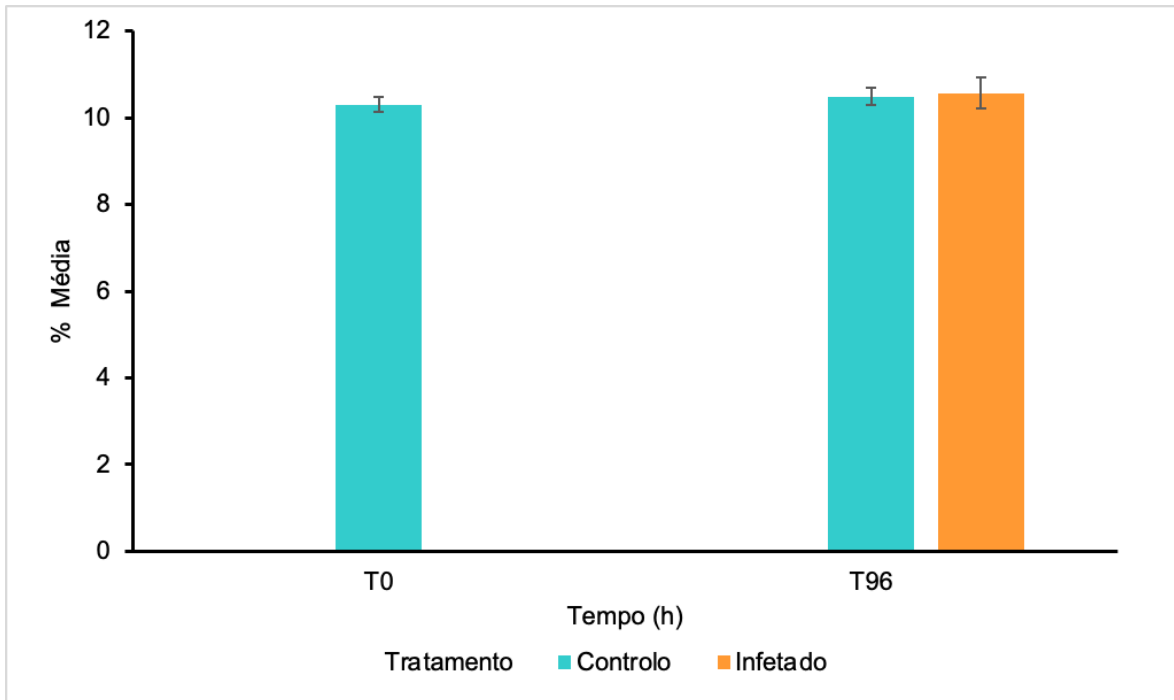


Figura 33: Gráfico de barras da média em percentagem de tripsina não inibida por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

No que diz respeito ao parâmetro óxido nítrico (Figura 34) estatisticamente observaram-se diferenças entre o grupo controlo às 96h com o grupo infetado às 96h ($p\text{-value} = 0,002$), e ainda existiu diferenças entre o grupo controlo às 0h e o grupo infetado às 96h ($p\text{-value} = 0,006$).

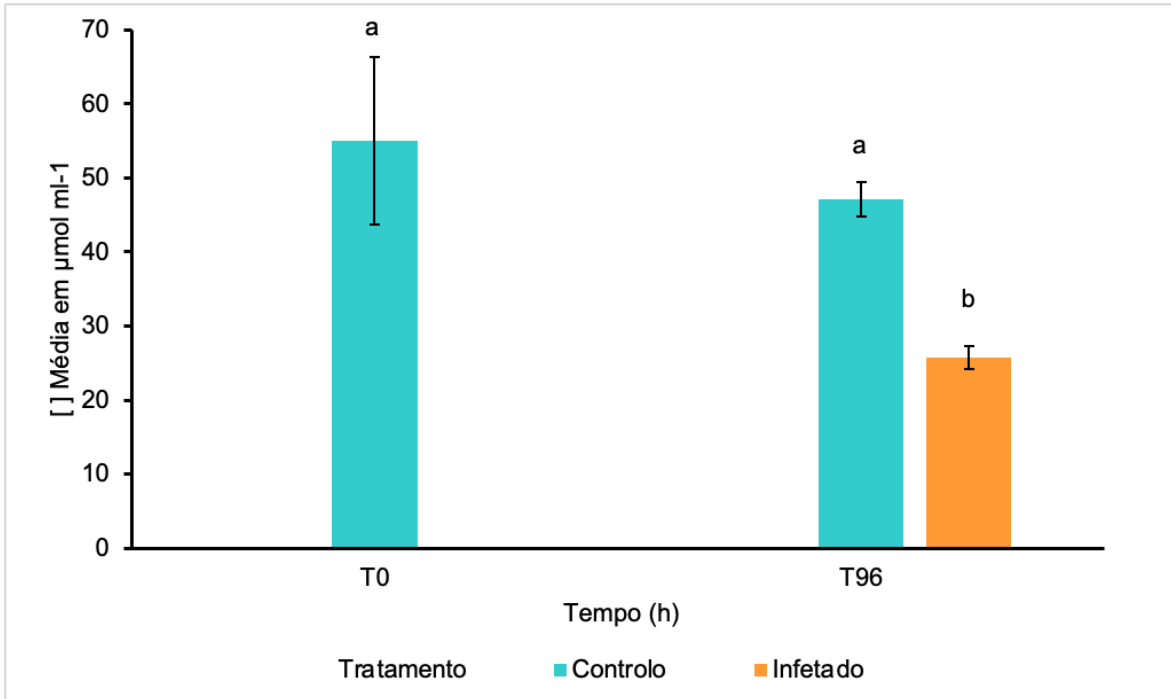


Figura 34: Gráfico de barras da média das concentrações de óxido nítrico em $\mu\text{mol ml}^{-1}$ por tempo e por tratamento. ANOVA um fator foi usada para comparar entre diferentes tempos de amostragem e diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

4.3 Resultados ensaio de viabilidade dos dinósporos após filtração pelas ostras nos peixes

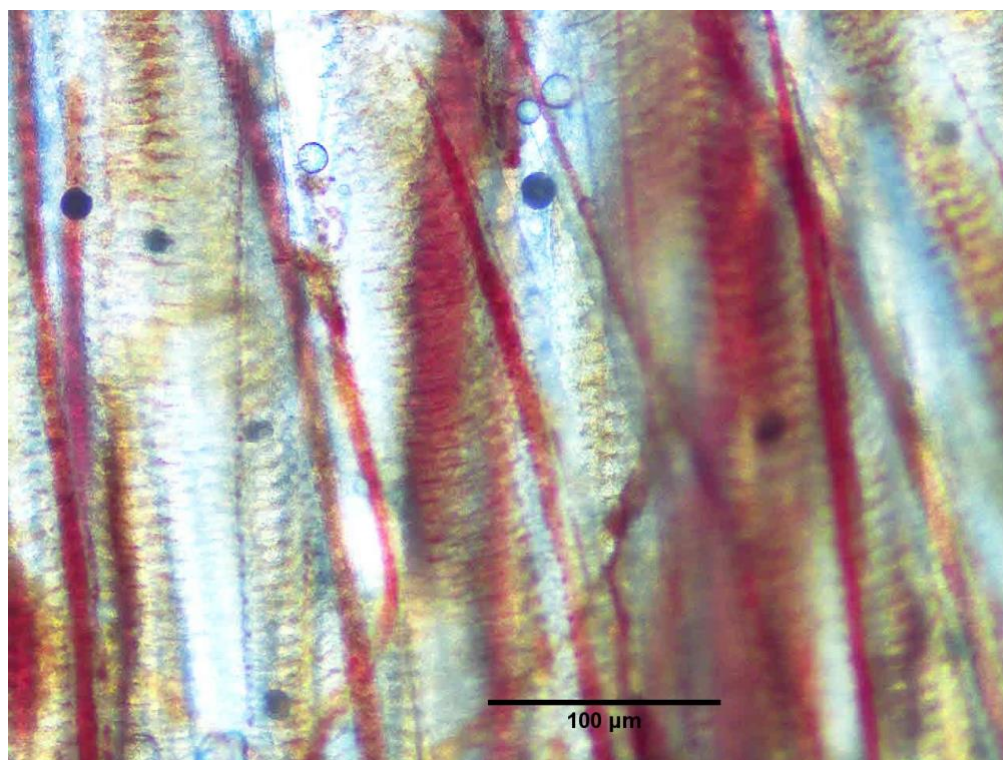
Na Figura 35 pode observar-se duas fotografias tiradas ao microscópio ótico (NIKON ECLIPSE Ci H550S) de dois arcos branquiais de dourada contendo trofontes de *A. ocellatum* (esferas pretas). Desta forma respondeu-se à pergunta: após filtração pela ostra os dinósporos continuam ativos, ou seja, ocorre a infeção de peixes depois da filtração das ostras? Após filtração dos dinósporos pelas ostras estes ainda têm capacidade infetante.

Na tabela 6 estão os resultados obtidos após observação das brânquias dos peixes ao microscópio ótico (Leica ICC50W).

Tabela 6: Dados obtidos do ensaio de viabilidade dos dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* após filtração pelas ostras (*Magallana gigas*). Legenda: I: grupo infetado, 1,2,3: replicados técnicos.

TRATAMEN TO	OSTRA S	PESO (g)	PEIX E	PESO (g)	Nº TOTAL DE TROFONTES POR ARCO BRANQUIAL
I1	1	249	1	142	15
I1	2	352	1		32
I1	3	345	2	143	38
I1	4	310	2		29
I2	1	284	3	115	113
I2	2	345	3		92
I2	3	288	4	104	49
I2	4	429	4		84
I3	1	257	5	139	58
I3	2	375	5		99
I3	3	420	6	115	24
I3	4	320	6		43

A



B

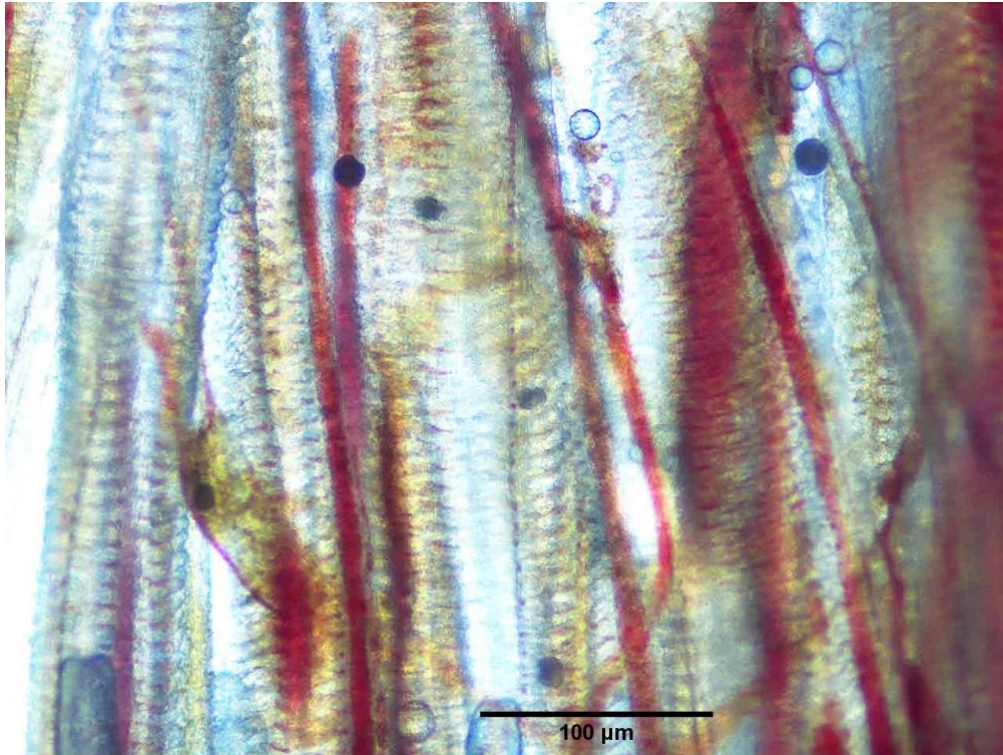


Figura 35: Fotografias tiradas ao microscópio ótico de dois arcos brânquias de *Sparus aurata*, contendo trofontes de *Amyloodinium ocellatum* (esferas pretas), com ampliação total de 100x. Barra de escala: 100μm.

5. Discussão

Na aquicultura, com o aumento drástico da produção de peixes, bivalves e algas para suprir as necessidades alimentícias da população, e na perspectiva de tornar a aquicultura uma atividade mais sustentável, tem-se apostado cada vez mais nos cultivos IMTA. O grande problema desta rápida aceleração de produção e na aposta nos cultivos IMTA é o surgimento de patologias de origem bacteriana, viral, parasitária e/ou fúngicas, já que este tipo de cultivos, com diferentes níveis tróficos, têm, conseqüentemente diferentes espécies no mesmo local, havendo uma maior possibilidade de transmissão interespecífica de patógenos. As doenças parasitárias nos peixes de aquicultura estão muitas vezes associadas a grandes perdas económicas, visto que os peixes ficam com morbidade, perda de apetite, redução da taxa de crescimento específica bem como redução da eficiência da conversão alimentar, o que, em último caso, leva a altas taxas de mortalidade.

De acordo com os autores Noga, (2012); Cabral et al., (2016); Massimo et al., (2022) o parasita *A. ocellatum*, representa um problema, que causa uma alta taxa de mortalidade em peixes, mesmo após pouco tempo de exposição ao parasita. Em sistemas de produção integrados (IMTA) é importante perceber se existe passagem deste parasita entre organismos de diferentes níveis tróficos. Sendo que uma das espécies de bivalves que se cultiva de forma integrada com peixes é a ostra, neste trabalho, esta foi infetada experimentalmente com dinósporos de *A. ocellatum* tendo-se verificado a transmissão do parasita para peixes, ou seja, os dinósporos do parasita após filtração pelas ostras mantêm a sua capacidade para infetar peixes, o que foi provado pela observação dos arcos branquiais dos peixes que foram colocados nos mesmos tanques das ostras, previamente infetadas e que revelaram a presença de trofontes de *A. ocellatum*. Isto sugere que as ostras são hospedeiros onde o parasita tem capacidade de completar o seu ciclo de vida, libertando dinósporos, capazes de infetar os peixes que estão no mesmo espaço. Este resultado indica, ainda, que as ostras são um potencial veículo de transmissão deste parasita em sistemas integrados (IMTA).

Para além da possibilidade de infestação das ostras interessa perceber quais os danos causados pelo parasita nas ostras. Através da análise histológica foi confirmada a presença do parasita *A. ocellatum* nas brânquias e glândula digestiva das ostras e foram avaliados os danos nos tecidos resultantes da infeção causada pelo parasita. Os resultados obtidos estão de acordo com Andrade (2015) e mostram lesões severas tanto nas brânquias como na glândula digestiva. Sabe-se que em peixes, a causa de mortalidade devido à amilodiosose é atribuída à anoxia, causada pela destruição dos tecidos das brânquias pelo

parasita durante infecções graves (Massimo et al., 2022; Moreira et al., 2022). Neste estudo não se verificou mortalidade, pelo que não é possível confirmar se existe mortalidade causada pelo parasita e não se consegue perceber se os danos observados nas ostras, poderão estar associados a mortalidade, caso estes sejam mais severos.

Nas brânquias, as lesões classificadas, hiperplasia epitelial, hipertrofia epitelial, ruptura do epitélio e necrose, verificou-se um aumento significativo da lesão no grupo infetado às 96h comparado com o grupo controlo, sugerindo que existe um pico de infeção às 96h. Este resultado poderá ter a ver com o ciclo do parasita que segundo Byadgi et al. (2020) demora entre 2 a 5 dias a completar. Os resultados estão de acordo com o reportado por vários autores (Dos Reis et al., 2020; Massimo et al., 2022) que verificaram as mesmas lesões provocadas por este parasita quer em ostras da espécie *Crassostrea brasiliana* quer em robalos (*Dicentrarchus labrax*).

Sendo o *A. ocellatum* um parasita descrito como um parasita de peixes, é vasta a bibliografia que refere os danos causados por este parasita nas brânquias de diferentes espécies (Seoud et al., 2017; Marques et al., 2019; Moreira et al., 2019; Byadgi et al., 2021). Foram reportadas lesões como hiperplasia de células epiteliais, descoloração das células do epitélio, inflamações, hiperplasia, hemorragias e necrose em situações de estado avançado de infeção por amilodinirose (Iwanowicz, 2011; Zang et al., 2021). Muitas destas lesões apresentadas em brânquias de peixes também foram encontradas nas brânquias das ostras, como: hiperplasia epitelial, hipertrofia epitelial, ruptura do epitélio, inflamação de hemócitos, e necrose, mostrando assim que em diferentes organismos de diferentes níveis tróficos os efeitos da infeção por amilodinirose são semelhantes. Estas observações trazem, ainda, uma importante informação, que este parasita não é exclusivo de peixes, e também infeta e provoca danos nos tecidos de outros organismos de níveis tróficos diferentes, como o caso das ostras deste estudo.

Relativamente às lesões causadas pelo parasita na glândula digestiva observou-se que a circularidade dos lúmens tubulares da glândula digestiva foi maior (ainda que não estatisticamente significativo) no grupo infetado, e observou-se também uma mudança de formato dos mesmos, sugerindo que as ostras do grupo infetado apresentaram mais lesões e, conseqüentemente, uma taxa de túbulos ativos inferior aos do grupo controlo. Estes resultados vêm de encontro aos obtidos no estudo de Medhioub et al. (2012), onde se verificou que a exposição de ostras a *Alexandrium ostenfeldii* resultou numa resposta inflamatória que consistiu na infiltração e diapedese de hemócitos no trato intestinal e na

diminuição da percentagem de túbulos digestivos ativos nas ostras alimentadas com *A. ostenfeldii*, mostrando que o dinoflagelado provocou danos a nível do trato intestinal.

Verificou-se que existiu uma evidente migração de hemócitos pelo tecido conetivo por diapedese para as zonas afetadas, onde o parasita se fixou na glândula digestiva. Os estudos descritos por Medhioub et al. (2012) e Lassudrie et al., (2014) com exposição de ostras (*Magallana gigas*) e amêijoas japonesas (*Ruditapes philippinarum*) ao dinoflagelado *A. ostenfeldii*, mostraram resultados semelhantes, nomeadamente uma grande mobilização de hemócitos por diapedese para as zonas afetadas, onde o dinoflagelado se fixou. A migração dos hemócitos para as áreas afetadas por organismos infecciosos, tem sido descrita como um mecanismo de defesa de resposta inata dos bivalves (Wang et al., 2018). Segundo Medhioud et al. (2012) os danos na glândula digestiva após exposição a *A. ostenfeldii* foram significativamente mais frequentes do que antes da exposição. A recuperação destas condições patológicas (hemócitos em redor e diapedese no sulco intestinal e nos túbulos digestivos, dilatação dos túbulos) foi mais rápida nas ostras alimentadas do que nas ostras não alimentadas após 7 dias de depuração.

Ainda se pretendeu verificar se os dinósporos de *A. ocellatum* após ingestão pelas ostras continuavam viáveis. Após recolha das fezes de ostras infetadas com o parasita, fez-se a incubação das fezes das ostras. Das incubações não se obteve um resultado conclusivo, dado que as mesmas continham muitos microrganismos com mobilidade que além de dificultarem a observação, podiam-se confundir com a fase de dinósporos do parasita por terem tamanho tão similar e bastante mobilidade. Durante os pré ensaios testaram-se diferentes espécies de microalga na alimentação das ostras em conjunto com o *A. ocellatum* para ajustar a que melhor se adequava ao trabalho e para que pudessemos distinguir o *A. ocellatum* quando observado ao microscópio, mesmo este estando misturado com as fezes. Ainda no pré ensaio, quando se observaram as fezes do controlo negativo (controlo sem presença de parasita), não se observou em momento algum a presença do parasita *A. ocellatum*, logo, e por este motivo, considerou-se que a depuração efetuada anteriormente tinha sido eficaz. A alimentação mais eficiente, para que não se confundisse com o *A. ocellatum* foi a alimentação com a microalga *P. tricornutum*, uma vez que tem um formato alongado parecido a uma agulha, facilmente distinguido nas fezes das ostras.

Os resultados obtidos em Moreira et al. (2022), sugeriram que o *A. ocellatum* produz compostos que podem ter um papel no processo de alimentação dos dinósporos e trofontes, que se ligam aos tecidos dos hospedeiros, explicando assim a severidade das lesões encontradas nos locais onde o parasita se agarra.

Estes resultados podem querer dizer que o parasita provoca danos mais severos e imediatos nas brânquias, mas, a longo prazo provoca danos mais graves na glândula digestiva. Se as ostras forem alimentadas, conseguem ter uma recuperação mais rápida dos danos causados pelos agentes patológicos. As brânquias sendo o órgão que está, diretamente, em contacto com o meio aquático exterior não terá tantas defesas como a glândula digestiva. Com isto, quer os danos num tecido quer no outro afetam a capacidade de absorção de nutrientes e alimentação das ostras deixando-as mais vulneráveis a outros organismos oportunistas.

Foi confirmada a presença do parasita no grupo controlo e infetado, por técnicas histológicas e moleculares. Este resultado embora surpreendente indica que as ostras no meio natural onde foram recolhidas, possivelmente, já tinham sido infetadas pelo parasita *A. ocellatum*, o que não é de estranhar dado que as ostras foram oriundas de um tanque de terra onde o parasita já tinha sido diagnosticado em peixes. Contudo, e por esta razão as ostras foram depuradas durante 7 dias, o que parece não ter sido eficaz na remoção total do parasita, uma vez que foram observados, no grupo controlo, tanto na glândula digestiva quer nas brânquias das ostras, trofontes do parasita em quantidades semelhantes ao grupo infetado. Por esta razão podemos justificar que os resultados obtidos no ensaio de infeção das ostras com o parasita mostraram resultados não significativos na glândula digestiva.

Visto que os controlos negativos também estavam infetados, fez-se uma quantificação em ambos os órgãos amostrados (brânquias e glândula digestiva) nos diversos momentos de amostragem, para verificar a intensidade de infeção. Verificou-se que existem diferenças significativas entre a quantidade de trofontes encontrados nos controlos comparados com os encontrados nos infetados, sendo encontrados em maior quantidade nos infetados T96h. Todos os cuidados durante amostragens foram tomados para que não existisse contaminação do grupo controlo, e todo o manuseamento dos tanques tinha o seu próprio material para evitar contaminar o grupo controlo. Assim pensa-se que o grupo de ostras já viriam infetadas com o parasita *A. ocellatum* dos tanques de terra e poderão estar a servir de repositório de *A. ocellatum* nestes tanques de cultivo.

Quanto à expressão genética, os primers testados apresentaram resultados de eficiência abaixo do considerado aceitável para prosseguir com a quantificação e, devido ao tempo disponível para a realização das análises, foi decidido não avançar com esta analítica. Assim, propõem-se que, em trabalhos futuros, sejam desenhados novos primers

com eficiências entre os 90 e os 100%, para avaliação da resposta imune em ostras *M. gigas*.

As técnicas moleculares de PCR e sequenciação, permitiram com rigor afirmar e confirmar que todas as amostras continham material genético de *A. ocellatum*, logo todas as ostras estavam infetadas, deixando assim de existir o controlo negativo necessário para comparação de dados e melhor compreensão dos mesmos.

Como invertebrados, as ostras desenvolveram um sistema imunitário inato integrado e altamente complexo para reconhecer e eliminar vários invasores através de uma série de reações imunitárias orquestradas, tais como reconhecimento imunitário, síntese de peptídeos antimicrobianos, bem como encapsulação e fagocitose dos hemócitos circulantes (Wang et al., 2018).

A lisozima é uma enzima hidrolítica que desempenha um papel importante na defesa contra bactérias e agentes infecciosos. Está presente nos hemócitos, hemolinfa e tecidos superficiais externos, tais como o manto e as brânquias (Itoh et al., 2010). A atividade da lisozima das ostras foi inicialmente relatada na hemolinfa e no muco cutâneo da *Crassostrea virginica* em 1967 (Wang et al., 2018). Neste estudo verificou-se um aumento do valor da concentração média de lisozima de 0,8µg/ml no grupo controlo no momento 0h para 1,5µg/ml no grupo infetado no momento 96h. Estes resultados não estão de acordo com os obtidos pelos autores Chu & La Peyre (1989), onde num estudo realizado com *C. virginica*, o valor da lisozima na hemolinfa tendeu a diminuir com o aumento do nível de infeção presente. Demonstraram também que os valores mais baixos de lisozima foram encontrados nas ostras recolhidas no período de verão, sendo este o período onde existe uma maior carga bacteriana devido às elevadas temperaturas, e por existir uma maior carga bacteriana esperar-se-ia que também fosse o período onde existisse maior concentração de lisozima na hemolinfa. Provaram ainda que a atividade da lisozima é superior em ostras infetadas/doentes com *Bucephalus* sp., quer no período de verão quer no período de inverno, em comparação com ostras não infetadas nas mesmas alturas do ano. Cronin et al. (2001) num estudo com *Ostrea edulis* e *M. gigas* verificaram que os níveis mais baixos de lisozima detetados na hemolinfa foram os recolhidos em junho, verão, estando de acordo com os resultados obtidos por Chu & La Peyre (1989). No presente trabalho a concentração de lisozima foi superior no grupo infetado às 96h, estando de acordo com Cronin et al. (2001) e Wang et al., (2018).

As protéases têm um papel importante na patogenicidade dos organismos parasitários e também nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Neste trabalho com o *A. ocellatum* não existiram diferenças entre os tratamentos nos momentos de amostragem em relação a atividade das protéases na hemolinfa e perante o resultado apresentado pode sugerir que o parasita não provocou danos no tecido onde foi retida a amostra ou não houve tempo suficiente para que fosse evidente o efeito do parasita na atividade das protéases. No estudo realizado pelos autores Brun et al. (2000), verificaram que a patologia associada à infecção por *Urastoma cyprinae*, nas brânquias, resulta em danos diretos no tecido do hospedeiro por meio de protéases segregadas ou pela degradação de moléculas do muco que protegem o tecido das brânquias de choques osmóticos ou de outros agentes nocivos, tais como bactérias.

O óxido nítrico é uma importante molécula de sinalização gasosa envolvida numa vasta gama de processos fisiológicos, tais como regulação vascular (Jiang et al., 2013), transmissão neural e especialmente defesa imunitária. O óxido nítrico foi detetado em hemócitos de vários bivalves incluindo ostras, amêijoas e mexilhões (Jiang et al., 2013), sugerindo que pode ser crucial para a regulação imunitária, uma vez que os hemócitos são as células mais importantes na hemolinfa dos bivalves marinhos (Liu et al., 2018). Nos resultados obtidos neste trabalho verificou-se uma diminuição do valor médio de óxido nítrico, do grupo controlo no momento 0h de 55 $\mu\text{mol/ml}$ para 25 $\mu\text{mol/ml}$ no grupo infetado no momento 96h. Existiu também uma diminuição embora não significativa no grupo controlo no momento 96h em relação ao momento 0h, que pode ser justificado devido ao controlo também estar parasitado. De acordo com Gestal et al. (2008), em mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, infetados com a bactéria *Vibrio tapetis* observou-se um aumento significativo da produção de óxido nítrico, isto sugere que na presença de um agente nocivo como uma bactéria, vírus ou parasita faz aumentar a produção de óxido nítrico. Segundo Wang et al. (2018), nas ostras, o parasita protozoário *Perkinsus marinus* pode ativar a resposta do óxido nítrico tanto in vitro como in vivo. Os resultados indicam que o óxido nítrico desempenha um papel nas defesas da *C. virginica* para a infecção experimental com o parasita protozoário *P. marinus*. Os autores Shi et al. (2012), no estudo realizado com vieiras da espécie *Chlamys farreri* após estimulação de LPS (lipopolisacarídeos), que induzem uma resposta inflamatória no organismo dos indivíduos, a concentração do óxido nítrico aumentou de 21,55 $\mu\text{mol/L}$ às 3h para 42,27 $\mu\text{mol/L}$ às 24h, onde atingiu o valor máximo. Os indivíduos às 48h já apresentavam um valor normal de óxido nítrico. Todos estes autores referem um aumento do valor de óxido nítrico nos organismos quando estes foram expostos a agentes patógenos que desencadearam uma resposta imunitária no

indivíduo. Os resultados obtidos no presente estudo e com base nos estudos efetuados anteriormente, o valor de óxido nítrico obtido às 96h já é um valor normal, sendo que o pico de concentração de óxido nítrico ter-se-ia dado entre as 3h e as 24h, segundo Shi et al. (2012).

Conclusões e Perspetivas Futuras

O estudo realizado nesta dissertação vem aumentar o conhecimento sobre o parasita *A. ocellatum*, a forma como este se propaga em cultivos IMTA, que é um ponto importantíssimo para uma indústria em desenvolvimento que cada vez mais aposta neste tipo de cultivo integrados.

Neste trabalho conseguimos atingir os objetivos propostos enunciados no início do estudo, concluindo-se que:

Os dinósporos de *A. ocellatum* são filtrados pelas ostras.

Os dinósporos, infetam as brânquias das ostras e conseguem fixar-se transformando-se em trofontes, completando o ciclo na ostra e mantendo assim a capacidade de infeção de peixes quando produzidos em IMTA.

As ostras são assim, um vetor de propagação do parasita *A. ocellatum* representando um perigo para as aquaculturas em IMTA, e têm de existir medidas no combate do mesmo, pois representa um grande problema para o setor.

Os dinósporos afetam severamente o epitélio branquial e o trato intestinal das ostras, principalmente ao tempo 96h de infeção.

Histologicamente concluiu-se que o *A. ocellatum* afetam severamente os tecidos, tanto das brânquias como da glândula digestiva das ostras, e que este se fixa aos tecidos da ostra, existindo maior prevalência às 96h após infeção.

Já na resposta imune os resultados obtidos através da avaliação da atividade da lisozima, mostram que as ostras são afetadas imunologicamente pelo parasita *A. ocellatum*, tentando combater o mesmo. Na atividade das proteases não existiram diferenças significativas. Para trabalhos futuros aumentar o número de indivíduos amostrados por ponto de amostragem poderia dar resultados mais significativos. Já a nível da concentração de óxido nítrico, o valor obtido às 96h, segundo outros autores, será de um valor já normalizado e que o pico de concentração seria entre as 3h e as 24h após infeção. Para trabalhos futuros a nível imunológico faz sentido aumentar os momentos de amostragem para 0h, 3h, 6h, 12h, 24h e 48h.

Considerações finais:

Este estudo também levanta questões como: quanto tempo os tecidos demoram a recuperar de uma infecção de amiloodiniose, se recuperam efetivamente, e se depois de infetadas ficam sempre “marcadas” com vestígios do parasita nos tecidos ou voltam a recuperar ao fim de algum tempo.

Neste estudo não se verificou mortalidade que o parasita causaria nas ostras, o que seria interessante de avaliar em trabalhos futuros.

Ainda em trabalhos futuros, para responder à questão de se as fezes das ostras não têm dinósporos nem tomontes viáveis, ter-se-ia de melhorar o protocolo de recolha e incubação das mesmas, talvez usando algum método químico de forma a ter melhor visibilidade nas incubações.

Perspetivas Futuras:

E como forma de melhoria a este trabalho, poder-se-ia voltar a fazer o mesmo estudo, mas garantido, quer por métodos moleculares quer por métodos físicos (depuração), que as ostras do controlo negativo não estariam infetadas, desta forma deve-se também melhorar as eficiências dos primers para que se pudesse ter mais conhecimento sobre a resposta imunitária das ostras perante este agente nocivo. Ainda se poderia fazer um estudo de avaliação dos danos causados pelo parasita *A. ocellatum* nos tecidos das ostras e perceber-se se existe recuperação dos tecidos e ao fim de quanto tempo. Este tipo de estudos é escasso na comunidade científica e devemos trabalhar para enriquecer a comunidade com mais conhecimento em bivalves e parasitologia marinha.

Referências

- Abreu, P.C., Robaldo, R.B., Sampiao, L.A., Ianchini, A. & Debrecht, C. (2005) Recurrent amyloodiniosis on broodstock of the Brazilian flounder *Purulichthys orbignyus*: dinospore monitoring and prophylactic measures. *Journal of the World Aquaculture Society* 36,42-50.
- Adzigbli, L., Hao, R., Jiao, Y., Deng, Y., Du, X., Wang, Q., & Huang, R. (2020). Immune response of pearl oysters to stress and diseases. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 513–523. <https://doi.org/10.1111/raq.12329>
- Alexander, K. A., & Hughes, A. D. (2017). A problem shared: Technology transfer and development in European integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Aquaculture*, 473, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.029>
- Andrade De Souza, N. (2015). *Resposta metabólica da ostra Crassostrea gigas na presença do parasita Amyloodinium ocellatum* (Master Thesis). Universidade do Algarve. <http://hdl.handle.net/10400.1/8444>
- Arzul, I., Gagnaire, B., Bond, C., Chollet, B., Morga, B., Ferrand, S., Robert, M., & Renault, T. (2009). Effects of temperature and salinity on the survival of *bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 85(1), 67–75. <https://doi.org/10.3354/dao02047>
- Bachère, E., Rosa, R. D., Schmitt, P., Poirier, A. C., Merou, N., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2015). The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular, and genetic view. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1), 50–64. doi:10.1016/j.fsi.2015.02.040
- Beraldo, P., Massimo, M., & Galeotti, M., *Amyloodinium ocellatum*. In Sitjà-Bobadilla, A., Bron, G. E., Wiegertjes, G., & Piazzon, M. C. (2021). *Fish Parasites, A handbook of protocols for their isolation, culture, and transmission*. UK, 5M Books Ltd, 2021, ISBN 9781789181333, pg 49 a 62.
- Bessat, M., & Fadel, A. (2018). Amyloodiniosis in cultured *Dicentrarchus labrax*: parasitological and molecular diagnosis, and an improved treatment protocol. *Diseases of Aquatic Organisms*, 129(1), 41–51. <https://doi.org/10.3354/dao03237>
- Biswas, G., Kumar, P., Ghoshal, T. K., Kailasam, M., De, D., Bera, A., Mandal, B., Sukumaran, K., & Vijayan, K. K. (2020). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) outperforms conventional polyculture with respect to environmental remediation, productivity, and economic return in brackishwater ponds. *Aquaculture*, 516 (September 2019), 734626. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734626>
- Bower, C. E., Turner, D. T., & Biever, R. C. (1987). A Standardized Method of Propagating the Marine Fish Parasite, *Amyloodinium ocellatum*. *The Journal of Parasitology*, 73(1), 85. doi:10.2307/3282348
- Brown, E. M. (1931). Note on a new Species of Dinoflagellate from the Gills and Epidermis of Marine Fishes. By.
- Brun, N. T., Ross, N. W., & Boghen, A. D. (2000). Changes in the electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urastoma cyprinae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(2), 163–170. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4917>

- Byadgi, O., Massimo, M., Dirks, R. P., Pallavicini, A., Bron, J. E., Ireland, J. H., Volpatti, D., Galeotti, M., Beraldo, P. (2021). Innate immune-gene expression during experimental amyloodiniosis in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 234, 110217. doi:10.1016/j.vetimm.2021.110217
- Byadgi, O., Beraldo, P., Volpatti, D., Massimo, M., Bulfon, C., & Galeotti, M. (2019). Expression of infection-related immune response in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during a natural outbreak from a unique dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 62–72. doi:10.1016/j.fsi.2018.09.069
- Cabral, L., Moreira, M., Soares, F., Cristiano, M. de L. S., (2016). O impacto da amiloodinose na aquacultura; Vias para o controlo desta parasitose. Em A europa e o mar: inovação e investigação científica em Portugal. Universidade do Algarve. pp81-84.
- Canier, L., Dubreuil, C., Noyer, M., Serpin, D., Chollet, B., Garcia, C., & Arzul, I. (2020). A new multiplex real-time PCR assay to improve the diagnosis of shellfish regulated parasites of the genus *Marteilia* and *Bonamia*. *Preventive Veterinary Medicine*, 183. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105126
- Carella, F., Sardo, A., Mangoni, O., Di Cioccio, D., Urciuolo, G., De Vico, G., & Zingone, A. (2015). Quantitative histopathology of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) exposed to the harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 130–140. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.001
- Chen, J., Jayachandran, M., Bai, W., & Xu, B. (2022). A critical review on the health benefits of fish consumption and its bioactive constituents. *Food Chemistry*, 369. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130874
- Chopin, T., Buschmann, A. H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraener, G. P., Zertuche-González, J. A., Yarish, C., Neefus, C. (2001). INTEGRATING SEAWEEDS INTO MARINE AQUACULTURE SYSTEMS: A KEY TOWARD SUSTAINABILITY. *Journal of Phycology*, 37(6), 975–986. doi:10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x
- Cobb, C. S., Levy, M. J., & Noga, E. J. (1998). Diseases of Aquatic Organisms, Acquired immunity to amyloodiniosis is associated with an antibody response. *Inter-Research*. Vol. 34, pp. 125–133.
- Colorni, A. (1994). Diseases of Aquatic Organisms Dis. aquat. Org. Hyperparasitism of *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida: Oodiniidae) on *Neobenedenia melleni* (Monogenea: Capsalidae) *Inter-Research*, Vol. 19, pp. 157–159.
- Cronin, M. A., Culloty, S. C., & Mulcahy, M. F. (2001). Lysozyme activity and protein concentration in the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 11(7), 611–622. https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0338
- Cruz-Lacierda, E.R., Maeno, Y., Pineda, A.J., Matey, V.E. (2004). Mass mortality of hatchery-reared milkfish (*Chanos chanos*) and mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) caused by *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida). *Aquaculture*, 236: 85–94.
- Cunha, M. E., Quental-Ferreira, H., Parejo, A., Gamito, S., Ribeiro, L., Moreira, M., Monteiro, I., Soares, F., & Pousão-Ferreira, P. (2019). Understanding the individual role of fish, oyster, phytoplankton and macroalgae in the ecology of integrated

production in earthen ponds. *Aquaculture*, 512 (March), 734297. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734297>

Chu, F.-L. E., & La Peyre, J. F. (1989). Effect of Environmental Factors and Parasitism on Hemolymph Lysozyme and Protein of American Oysters (*Crassostrea virginica*). In *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY* (Vol. 54).

Dijk, H. V., Fischer, A. R. H., Honkanen, P., & Frewer, L. J. (2011). Perceptions of health risks and benefits associated with fish consumption among Russian consumers. *Appetite*, 56(2), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2010.12.008>

Doca pesca, Consumo de Peixe em Portugal, visitado a 11/11/2021 <https://sites.google.com/site/docapescacreative/consumo-de-peixe-em-portugal>

dos Reis, I. M. M., Siebert, M. N., Zacchi, F. L., Mattos, J. J., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G. de, Piazza, C. E., Bicego, M. C., Taniguchi, S., Melo, C. M. R. de, & Bainy, A. C. D. (2020). Differential responses in the biotransformation systems of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789) elicited by pyrene and fluorene: Molecular, biochemical and histological approach – Part II. *Aquatic Toxicology*, 226(February), 105565. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105565>

Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., & Li, L. (2013). Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Magallana gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(3), 939–945. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.007

FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

Francis-Floyd, R., & Floyd, M. R. (2011). *Amyloodinium-ocellatum-an-Important-Parasite-of-Cultured-Marine-Fish*. SRAC Publication No. 4705.

Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J.-Y., Saulnier, D., & Renault, T. (2007). Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Magallana gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology*, 84(1), 92–102. doi:10.1016/j.aquatox.2007.06.002

Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R., Venier, P., & Figueras, A. (2008). Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Reviews in Fisheries Science*, 16(SUPPL.1), 131–154. <https://doi.org/10.1080/10641260802325518>

Gómez, F., & Gast, R. J. (2018). Dinoflagellates *Amyloodinium* and *Ichthyodinium* (Dinophyceae), parasites of marine fishes in the South Atlantic Ocean. *Diseases of Aquatic Organisms*, 131(1), 29–37. <https://doi.org/10.3354/dao03274>

Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.-C., Gueguen, Y., & Bachère, E. (2005). Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(2), 1089–1097. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.075

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2020). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway., available online at <http://www.algaebase.org>

Han, Z., Li, J., Wang, W., Li, J., Zhao, Q., Li, M., Wang, L., & Song, L. (2021). A calmodulin targeted by miRNA scaffold659_26519 regulates IL-17 expression in the early

immune response of oyster *Magallana gigas*. Developmental and Comparative Immunology, 124. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104180>

- Herbst, S., Muhd-farouk, H., Amin-safwan, A., & Ikhwanuddin, M. (2016). EFFECT OF DIFFERENT FIXATIVES ON DIFFERENT ORGANS OF ORANGE MUD. March. <https://www.researchgate.net/publication/305349363>
- Holdt, S. L., & Edwards, M. D. (2014). Cost-effective IMTA: a comparison of the production efficiencies of mussels and seaweed. *Journal of Applied Phycology*, 26(2), 933–945. doi:10.1007/s10811-014-0273-y
- Huang Y, Wu L, Jin M, Hui K and Ren Q (2017) A C1qDC Protein (HcC1qDC6) with Three Tandem C1q Domains Is Involved in Immune Response of Triangle-Shell Pearl Mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Front. Physiol.* 8:521. doi: 10.3389/fphys.2017.00521
- Itoh, N., Okada, Y., Takahashi, K. G., & Osada, M. (2010). Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.027>
- Iwanowicz, D. D. (2011). *Overview On The Effects Of Parasites On Fish Health*. United States Geological Survey, Leetown Science Center, National Fish Health Research Laboratory, 11649 Leetown Road, Kearneysville, WV 25430. <https://www.researchgate.net/publication/230635404>
- Jiang, Q., Zhou, Z., Wang, L., Shi, X., Wang, J., Yue, F., Yi, Q., Yang, C., & Song, L. (2013). The immunomodulation of inducible nitric oxide in scallop *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.011>
- Johnson, S.K. (1984) Evaluation of Several Chemicals for Control of *Amyloodinium ocellatum*, a Parasite of Marine Fishes. Texas A & M University FDDL-M5, College Station, Texas, 4 pp.
- Kleitou, P., Kletou, D., & David, J. (2018). Is Europe ready for integrated multi-trophic aquaculture? A survey on the perspectives of European farmers and scientists with IMTA experience. *Aquaculture*, 490 (June 2017), 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.035>
- Kuperman, B.I., Matey, V.E. and Hurlbert, S.H. (2001) Parasites of fish from the Salton Sea, California, USA. *Hydrobiologia* 466,195-208.
- Lallias, D., Arzul, I., Heurtebise, S., Ferrand, S., Chollet, B., Robert, M., Beaumont, A. R., Boudry, P., Morga, B., & Lapègue, S. (2008). Bonamia ostreae-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: Experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources*, 21(4), 423–439. <https://doi.org/10.1051/alr:2008053>
- La Peyre, M. K., Nickens, A. D., Volety, A. K., Tolley, G. S., La Peyre, J. F. (2003). Environmental significance of freshets in reducing *Pekinus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica*: potential management applications. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 248: 165–176, 2003
- Landsberg, J. H., Steidinger, K. A., Blakesley, B. A., & Zondervan, R. L. (1994). Scanning electron microscope study of dinospores of *Amyloodinium ocellatum*, a pathogenic dinoflagellate parasite of marine fish, and comments on its relationship to the Peridiniales. *Inter-Research*, Vol. 20, pp. 23–32.

- Lassudrie, M., Soudant, P., Richard, G., Henry, N., Medhioub, W., da Silva, P. M., Donval, A., Bunel, M., le Goïc, N., Lambert, C., de Montaudouin, X., Fabioux, C., & Hégaret, H. (2014). Physiological responses of Manila clams *Venerupis (=Ruditapes) philippinarum* with varying parasite *Perkinsus olseni* burden to toxic algal *Alexandrium ostenfeldii* exposure. *Aquatic Toxicology*, 154, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.002>
- Levy, M.G., M.F. Poore, A. Colorni, E.J. Noga, M.W. Vandersea, & R.W. Litaker. (2007). A highly specific PCR assay for detecting the fish ectoparasite *Amyloodinium ocellatum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73:219-226.
- Liu, R., Cheng, Q., Wang, X., Chen, H., Wang, W., Zhang, H., Wang, L. Song, L. (2017). The B-cell translocation gene 1 (Cg BTG1) identified in oyster *Magallana gigas* exhibit multiple functions in immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 61, 68–78. doi:10.1016/j.fsi.2016.12.005
- Liu, Z., Li, M., Yi, Q., Wang, L. & Song, L. (2018). The Neuroendocrine-Immune Regulation in Response to Environmental Stress in Marine Bivalves. *Front. Physiol.* 9:1456. doi: 10.3389/fphys.2018.01456
- Lom, J., Lawler, A.R. (1973). A structural study of the mode of attachment in dinoflagellates invading gills of Cyprinodontidae. *Protistologica* 9, 293–309.
- MacDonald, B. A., Robinson, S. M. C., & Barrington, K. A. (2011). Feeding activity of mussels (*Mytilus edulis*) held in the field at an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) site (*Salmo salar*) and exposed to fish food in the laboratory. *Aquaculture*, 314(1-4), 244–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.01.045
- 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 Immunology*, 42(2), 353–362. doi:10.1016/j.fsi.2014.11.024
- Marques, C. L., Medeiros, A., Moreira, M., Quental-Ferreira, H., Mendes, A. C., Pousão-Ferreira, P., Soares, F. (2019). Report and genetic identification of *Amyloodinium ocellatum* in a sea bass (*Dicentrarchus labrax*) broodstock in Portugal. *Aquaculture Reports*, 14(), 100191–. doi:10.1016/j.aqrep.2019.100191
- Martoja, R. & M. Martoja-Pearson. 1970. *Técnicas de Histología Animal*. Toray-Masson. Barcelona, 350 pp.
- Massimo, M. (2019). *New Perspectives in the control of Amyloodinium ocellatum infection in reared sea bass (Dicentrarchus labrax)* (Doctoral dissertation). Università Degli Studi Di Udine, hic sunt futura.
- Massimo, M., Volpatti, D., Galeotti, M., Bron, J. E., & Beraldo, P. (2022). News Insights into the Host-Parasite Interactions of Amyloodiniosis in European Sea Bass: A Multi-Modal Approach. *Pathogens*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens11010062>
- Masson, I., Lotz, J. M., & Blaylock, R. B. (2013). Population model for *Amyloodinium ocellatum* infecting the spotted seatrout *Cynoscion nebulosus* and the red snapper *Lutjanus campechanus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106(2), 139–148. <https://doi.org/10.3354/dao02637>
- Medhioub, W., Lassus, P., Truquet, P., Bardouil, M., Amzil, Z., Sechet, V., Sibat, M., & Soudant, P. (2012). Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed

to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Aquaculture*, 358–359, 108–115.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.023>

- Menezes, J. (1994). Doenças em peixes cultivados no Estuário do Sado e o seu controlo. In: Seminário sobre recursos haliêuticos do pescado da Península de Setúbal (Setúbal, 26-27 de abril 1994). Publicações Avulsas do IPIMAR, 1, 175-186.
- Menezes, J. (2000). Parasitoses. In: Manual Sobre Doenças de Peixes Ósseos. Publicações Avulsas do IPIMAR, 3, 75-114.
- Moreira, M., Herrera, M., Pousão-Ferreira, P., Triano, J. I. N., & Soares, F. (2018). Stress effects of amyloodiniosis in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 127(3), 201–211. <https://doi.org/10.3354/dao03199>
- Moreira, M., Soliño, L., Marques, C. L., Laizé, V., Pousão-Ferreira, P., Costa, P. R., & Soares, F. (2022). Cytotoxic and Hemolytic Activities of Extracts of the Fish Parasite Dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*. *Toxins*, 14(7).
<https://doi.org/10.3390/toxins14070467>
- Moreira, M., Schrama, D., Farinha, A.P., Cerqueira, M., Raposo de Magalhães, C., Carrilho, R., Rodrigues, P. (2021). Fish Pathology Research and Diagnosis in Aquaculture of Farmed Fish; a Proteomics Perspective. *Animals*, 11, 125.
<https://doi.org/10.3390/ani11010125>
- Moreira, M., Schrama, D., Soares, F., Wulff, T., Pousão-Ferreira, P., Rodrigues, P. (2017). Physiological responses of reared sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) to an *Amyloodinium ocellatum* outbreak. *Journal of Fish Diseases*, 40(11), 1545–1560.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12623>
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, P., Halling, C., Shpigel, M., Yarish, C. (2004). Integrated aquaculture: rationale, evolution, and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 231, 361–391.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.015>.
- Neori, A., Troell, M., Chopin, T., Yarish, C., Critchley, A., & Buschmann, A. H. (2007). The Need for a Balanced Ecosystem Approach to Blue Revolution Aquaculture. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 49(3), 36–43.
doi:10.3200/envt.49.3.36-43
- Noga, E. J. (1989). Culture conditions affecting the in vitro propagation of *Amyloodinium ocellatum*, Inter-Research/Printed in F. R. Germany 0177-51 03/89/0006/0137/\$ 03.00, Vol. 6, pp. 137–143.
- Noga, E.J., (2010). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Wiley-Blackwell, Ames, 367 pp. ISBN: 9781119949466
- Noga, E. J., (2012). *Amyloodinium ocellatum*. In Woo, P. T.K., & Buchmann, K. *Fish Parasites, Pathobiology and Protection*. UK, CABI, 2012, ISBN-13: 978 1 84593 806 2, pg 19 a 29
- Noga, E. J., & Bower, C. E. (1987). Propagation of the marine & noflagellate *Amyloodinium ocellatum* under germ-free conditions. *J. Parasit.* 73: 924-928
- Noga, E. J., & Levy, M.G., (2006). Phylum Dinoflagellata. In: WOO, P.T.K. *Fish Diseases and Disorders: Protozoan and Metazoan Infections*. vol. 1, 2^a ed. CAB International, Wallingford. p.16-45.

- Nozzi, V., Strofaldi, S., Piquer, I. F., Di Crescenzo, D., Olivotto, I., & Carnevali, O. (2016). *Amyloodinium ocellatum* in *Dicentrarchus labrax*: Study of infection in salt water and freshwater aquaponics. *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 179–185. doi:10.1016/j.fsi.2016.07.036
- Oestmann, D. J. & Lewis, D. H. (1995). A method for producing microbe-free *Amyloodinium ocellatum* (Brown) with Percoll. *Veterinary Parasitology* 59 (1995) 169-175, SSD10304-4017(94)00746-2
- Omont, A., Elizondo-González, R., Quiroz-Guzman, E., Escobedo-Fregoso, C., Hernández-Herrera, R., & Peña-Rodríguez, A. (2020). Digestive microbiota of shrimp *Penaeus vannamei* and oyster *Magallana gigas* co-cultured in integrated multi-trophic aquaculture system. *Aquaculture*, 735059. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735059
- Owatari, M. S., Sterzelecki, F. C., da Silva, C. S., Magnotti, C., Mouriño, J. L. P., & Cerqueira, V. R. (2020). Amyloodiniosis in farmed *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879): Case report of successful therapeutic control with copper sulfate. *Parasitology International*, 76 (May 2019), 102091. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102091>
- Paixão, L. F., Santos, R. F. B., Ramos, F. M., & Fujimoto, R. Y. (2013). Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (Osteichthyes: Characidae). *Acta Amazonica*, 43(2), 211–216. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672013000200012>
- Paperna, I., (1984). Chemical control of *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) (Dinoflagellida) infections: in vitro tests and treatment trials with infected fishes. *Aquaculture*, 38: 1-18.
- Passos, R., Correia, A. P., Ferreira, I., Pires, P., Pires, D., Gomes, E., do Carmo, B., Santos, P., Simões, M., Afonso, C., & Baptista, T. (2021). Effect on health status and pathogen resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with diets supplemented with *Gracilaria gracilis*. *Aquaculture*, 531(August 2020), 735888. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735888>
- Pereira, J. C., Abrantes, I., Martins, I., Barata, J., Frias, P., & Pereira, I. (2011). Ecological and morphological features of *Amyloodinium ocellatum* occurrences in cultivated gilthead seabream *Sparus aurata* L.; A case study. *Aquaculture*, 310(3-4), 289–297. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.011
- Picón-Camacho, S. M., Thompson, W. P., Blaylock, R. B., & Lotz, J. M. (2013). Development of a rapid assay to detect the dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Veterinary Parasitology*, 196(3–4), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.010>
- Ramos, P., & Oliveira, J. M. (2001). Amiloodiniose em pregado, *Psetta maxima* (L.). *Revista portuguesa de ciências veterinárias*. 96 (540) 201-205.
- Ranjbar, H. & Khoramian, S. (2019). First report of *Amyloodinium ocellatum* (E. Brown) E. Brown & Hovasse, 1946 (dinoflagellate, blastodiniales, oodiniaceae) from sobaity seabream, *sparidentex hasta* (valenciennes, 1830) cultured in Persian Gulf of Iran, *Aquaculture Studies*19(1), 77-80. doi: 10.4194/2618-6381-v19_1_08

- Regulamento (UE) N°37/2010 da Comissão de 22 de dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente ativas e respetiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal
- Ríos-Castro, R., Aranguren, R., Romero, A., Banchi, E., Pallavicini, A., Novoa, B., & Figueras, A. (2022). Assessment of the environmental distribution of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* by next-generation sequencing, qPCR and histopathology allows the identification of alternative bivalve hosts. *Aquaculture*, 552. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737984>
- Roberts-Thompson, A., Barnes, A., Fielder, D.S., Robert, J.G., Adlard, L., & Adlard, R.D. (2006). Aerosol dispersal of the fish pathogen, *Amyloodinium ocellatum*. *Aquaculture*, 257:118-123. [10.1016/j.aquaculture.2006.02.058](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.058)
- Rodrigues, S. (2021). REA Relatório do estado do ambiente Portugal 2020/21. Agência portuguesa do ambiente (apa).
- Ryther, J. H. (2009). THE EVOLUTION OF INTEGRATED AQUACULTURE SYSTEMS1. *Journal of the World Mariculture Society*, 14(1-4), 471–484. [doi:10.1111/j.1749-7345.1983.tb00099.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1983.tb00099.x)
- Samocha, T.M., Fricker, J., Ali, A.M., Shpigel, M., Neori, A., 2015. Growth and nutriente uptake of the macroalga *Gracilaria tikvahiae* cultured with the shrimp *Litopenaeus vannamei* in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system. *Aquaculture* 446, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.008>.
- Saraiva, A., Jerónimo, D., & Cruz, C. (2011). *Amyloodinium ocellatum* (Chromalveolata: Dinoflagellata) in farmed turbot. *Aquaculture*, 320(1–2), 34–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.034>
- Schmitt, P., Duperthuy, M., Montagnani, C., Bachère, E., & Destoumieux-Garzón, D. (2011). Immune responses in the Pacific oyster *Magallana gigas*: An overview with focus on summer mortalities. In *Oysters: Physiology, Ecological Distribution and Mortality*, Chapter 9. ISBN 978-1-62100-518-6 © 2011 Nova Science Publishers, Inc.
- Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., Lorgetil, J. De, Bachère, E., & Destoumieux-garzón, D. (2012). The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Magallana gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident / pathogenic microflora. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00160>
- Seoud, S., Zaki, V. H., Ahmed, G. E., & Abd El-Khalek, N. K. (2017). Studies on *Amyloodinium* Infestation in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*.) Fishes with Special Reference for Treatment "Studies on *Amyloodinium* Infestation in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*.) Fishes with Special Reference for Treatment. *American Journal of Marine Science*, 5(1), 18–33. <https://doi.org/10.12691/marine-5-1-3>
- Shi, X., Wang, L., Zhou, Z., Yang, C., Gao, Y., Wang, L., & Song, L. (2012). The arginine kinase in Zhikong scallop *Chlamys farreri* is involved in immunomodulation. *Developmental and Comparative Immunology*, 37(2), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.008>
- Shumway, S.E., & Parsons, G.J., *Scallops: biology, ecology, and aquaculture*. Elsevier; (2016). ISSN: 0167-9309. 1460 p.

- Silva, C. R. C. (2017). Avaliação da qualidade e da segurança microbiológica da ostra-do-Pacífico (*Magallana gigas*) e do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*).
- Skriptsova, A.V., Miroshnikova, N.V., 2011. Laboratory experiment to determine the potential of two macroalgae from the Russian Far-East as biofilters for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Bioresour. Technol.* 102, 3149–3154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.093>.
- Soares, F., Quental-Ferreira, H., Moreira, M., Cunha, E., Ribeiro, L., & Pousão-Ferreira, P. (2012). First report of *Amyloodinium ocellatum* in farmed meagre (*Argyrosomus regius*). In *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, Vol. 30, Issue 1.
- Soeth, M., Corrêa LIMA, L., & Alexandre DAROS, F. (2013). Amiloodiniose em juvenis de *Diplodus argenteus* (Sparidae) mantidos em diferentes salinidades, Vol. 39, Issue 1.
- Sommerville, C. (2009). Controlling parasitic diseases in aquaculture: new developments. *New Technologies in Aquaculture*, 215–243. doi:10.1533/9781845696474.2.215
- Souza, N. (2015). Resposta metabólica da ostra *Magallana gigas* na presença do parasita *A. ocellatum*. Universidade do Algarve. pp. 1-23.
- Sueiro, R. A., Lamas, J., Palenzuela, O., Gulias, P., Diez-Vives, C., García-Ulloa, A., & Leiro, J. M. (2022). A real-time quantitative PCR assay using hydrolysis probes for monitoring *scuticociliate* parasites in seawater. *Aquaculture*, 557. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738303>
- Suquet, M., de Kermoisan, G., Araya, R. G., Queau, I., Lebrun, L., Le Souchu, P., & Mingant, C. (2009). Anesthesia in Pacific oyster, *Magallana gigas*. *Aquatic Living Resources*, 22(1), 29–34. doi:10.1051/alr/2009006
- Tafalla, C., Gómez-León, J., Novoa, B., & Figueras, A. (2003). Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(3), 197–205. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00098-8)
- Tahraoui, S., Ennaffah, B., Belattmania, Z., Reani, A., & Sabour, B. (2018). First report on the occurrence and dynamics of the ectoparasitic Dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* in the Moroccan Atlantic coast. *Research Journal of Environmental Sciences*. ISSN 1819-3412 <https://doi.org/10.3923/rjes.2018>
- Toledo-Silva, G. de, Siebert, M. N., Medeiros, I. D., Sincero, T. C. M., Moraes, M. O., Goldstone, J. V., & Bainy, A. C. D. (2008). Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Magallana gigas*. *Marine Environmental Research*, 66(1), 15–18. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.010
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A.H., Kautsky, N., Yarish, C. (2003). Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture* 226, 69–90. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00469-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00469-1).
- Vaz, M.; Pires, D.; Pires, P.; Simões, M.; Pombo, A.; Santos, P.; do Carmo, B.; Passos, R.; Costa, J.Z.; Thompson, K.D.; Baptista, T. (2022). Early Immune Modulation in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Juveniles in Response to Betanodavirus Infection. *Fishes* 2022, 7, 63. <https://doi.org/10.3390/fishes7020063>
- Vilavert, L., Borrell, F., Nadal, M., Jacobs, S., Minnens, F., Verbeke, W., Marques, A., & Domingo, J. L. (2017). Health risk/benefit information for consumers of fish and

shellfish: FishChoice, a new online tool. *Food and Chemical Toxicology*, 104, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.004>

- Wang, L., Song, X., & Song, L. (2018). The oyster immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.025>
- Wang, Q., Yu, Y., Zhang, X., & Xu, Z. (2019). Immune responses of fish to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich): A model for understanding immunity against protozoan parasites. *Developmental and Comparative Immunology*, 93(October 2018), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.01.002>
- Wang, S., Peatman, E., Liu, H., Bushek, D., Ford, S. E., Kucuktas, H., Quilang, J., Li, P., Wallace, R., Wang, Y., Guo, X., Liu, Z. (2010). Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6), 921–929. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.035
- Wei, J., Liu, B., Fan, S., Li, H., Chen, M., Zhang, B., Su, J., Meng, Z., & Yu, D. (2017). Differentially expressed immune-related genes in hemocytes of the pearl oyster *Pinctada fucata* against allograft identified by transcriptome analysis. *Fish and Shellfish Immunology*, 62, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.025>
- WoRMS World Register of Marine Species visited a 10/11/2021 em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=562984on>
- Woo P.T.K. (2007) Protective immunity in fish against protozoan diseases. *Parassitologia* 49, 185–191.
- Zhao, Q., Wang, W., Li, J. X., Yuan, P., Liu, Y., Li, Y., Wang, L., Song, L. (2021). The DNA cytosine-5-methyltransferase 3 (DNMT3) involved in regulation of CgIL-17 expression in the immune response of oyster *Magallana gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, 123, 104092. doi:10.1016/j.dci.2021.104092
- Zhao, X., Wang, Q., Jiao, Y., Huang, R., Deng, Y., Wang, H., & Du, X. (2012). Identification of Genes Potentially Related to Biomineralization and Immunity by Transcriptome Analysis of Pearl Sac in Pearl Oyster *Pinctada martensii*. *Marine Biotechnology*, 14(6), 730–739. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9438-3>
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Yin, Y., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi: 10.1038/nature11413
- Zhang, Y., Hu, J., Li, Y., Zhang, M., Jacques, K. J., Gu, W., Sun, Y., Sun, J., Yang, Y., Xu, S., Wang, Y., & Yan, X. (2021). Immune response of silver pomfret (*Pampus argenteus*) to *Amyloodinium ocellatum* infection. *Journal of Fish Diseases*, 44(12), 2111–2123. <https://doi.org/10.1111/jfd.13524>

Zhang, Y., Yu, F., Li, J., Tong, Y., Zhang, Y., & Yu, Z. (2014). The first invertebrate RIG-I-like receptor (RLR) homolog gene in the pacific oyster *Magallana gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(2), 466–471. doi:10.1016/j.fsi.2014.07.029

Anexos

Anexo A: Protocolo de Anestesia de Ostras (Suquet et al., 2009)

Material:

- Cloreto de magnésio (MgCl₂)
- Água do mar
- Água destilada
- Balança
- Refratômetro

Procedimento:

1. Preparar a água da anestesia com 1,5x mais água doce do que água salgada. (Por exemplo. Para 1 L de água de anestesia: 0,6 L de água destilada; 0,4 L de água do mar).
2. Adicionar 50 g de MgCl₂ por litro de água de anestesia.
3. O MgCl₂ aumenta a salinidade, daí a necessidade de diluir a água do mar com água destilada. Verificar a salinidade para manter valores de referência para as ostras.
4. Introduzir as ostras na água da anestesia e aguardar 16h.
5. Após serem realizados os procedimentos, as ostras deverão ser postas em água do mar limpa e arejada.

Notas: Após a realização deste protocolo, verificou-se que a salinidade estava demasiado elevada, tendo-se diluído a água da anestesia com mais 0,2 L de água destilada. A anestesia revelou-se igualmente eficaz.

Anexo B: Protocolo para a elaboração de solução de Davidson (Shaw & Battle, 1957):

Para obtermos 1L desta solução:

- 200ml de formol comercial (37-40%);
- 100ml de glicerol;
- 300ml de etanol absoluto;
- 300ml de água do mar filtrada (filtro 0,22 μ m);
- 100ml ácido acético glacial (antes de usar).

Juntar todos os compostos e colocamos a agitar numa placa de agitação até estar completa a dissolução dos mesmos. Adicionar os 100ml ácido acético glacial no dia de utilização da solução – 100ml para 1L de solução.

Anexo C: Protocolo de coloração de histologia:

- 1 – Xilol (15 min)
- 2 – Xilol – 6 imersões
- 3 – Álcool 100% - 6 imersões
- 4 - Álcool 100% - 6 imersões
- 5 - Álcool 96% - 6 imersões
- 6 - Álcool 70% - 6 imersões
- 7 - Álcool 50% - 6 imersões
- 8 – Água destilada – 2 min
- 9 – Hematoxilina – 10 min
- 10 – Água da torneira – 5 min
- 11 – Álcool ácido – 2 min
- 12 – Água da torneira – 5 min
- 13 - Álcool 96% - 3 min
- 14 – Eosina – 30 segs
- 15 - Água da torneira – 30 segs
- 16 - Álcool 96% - 6 imersões
- 17 - Álcool 96% - 6 imersões
- 18 - Álcool 100% - 6 imersões
- 19 - Álcool 100% - 6 imersões
- 20 – Xilol – 25 min
- 21 – Xilol – até à montagem

Anexo D: Protocolo de extração de RNA:

1. Adicionar 1ml de reagente Trizol por cada 200mg de amostra e homogeneizar;
2. Incubar durante 5 min para permitir a dissociação completa do complexo de nucleoproteínas;
3. Adicionar 0,2 mL de clorofórmio por 1 mL de reagente TRIzol™ usado para a lise e, em seguida, tampe bem o tubo;
4. Incubar por 2-3 minutos;
5. Centrifugar a amostra por 15 minutos a 12.000 × g a 4°C. A mistura separa-se num fenol-clorofórmio vermelho inferior, e interfase e uma fase aquosa superior incolor;
6. Transferir a fase aquosa contendo o RNA para um novo tubo inclinando o tubo a 45° e pipetando a solução;
7. Adicione 0,5 mL de isopropanol à fase aquosa, por 1 mL de Reagente TRIzol™ usado para lise;
8. Incubar por 10 minutos;
9. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 × g a 4°C. O precipitado de RNA total forma uma pellet branco semelhante a um gel no fundo do tubo;
10. Descartar o sobrenadante com uma micropipeta;
11. Ressuspender o pellet em 1 mL de etanol a 75% por 1 mL de Reagente TRIzol™ usado para a lise;
12. Vortex a amostra brevemente, depois centrifugar por 5 minutos a 7500 × g a 4°C;
13. Descartar o sobrenadante com uma micropipeta;
14. Aspirar ou secar ao ar o pellet de RNA por 5 a 10 minutos.
15. Ressuspender o pellet em 20–50 µL de água sem RNase, EDTA 0,1 mM ou solução SDS 0,5% pipetando para cima e para baixo.

Anexo E: Protocolo do FastDNA™ Spin Kit for Soil utilizado

1. Adicionar até 500 mg da amostra ao tubo Lysing Matrix E;
2. Adicionar 978 µL de tampão de fosfato de sódio à amostra do tubo Lysing Matrix E;
3. Adicionar 122 µL de tampão MT;
4. Homogeneizar num agitador FastPrep por 40 segundos;
5. Centrifugar a 14.000 x g por 5-10 minutos para sedimentar resíduos celulares;
6. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo de microcentrifugação. Adicionar 250 µL de PPS (Solução de precipitação proteica) e inverter para misturar 10 vezes;
7. Centrifugar a 14.000 x g por 5 minutos para os resíduos precipitarem. Transferir o sobrenadante para um tubo de 15 ml limpo;
8. Ressuspender a suspensão da matriz de ligação (Binding matrix suspension) e adicionar 1,0 ml ao sobrenadante num tubo de 15 ml;
9. Colocar no rotador ou inverter manualmente por 2 minutos para permitir a ligação do DNA. Colocar um tubo num suporte por 10 minutos e permitir que a matriz sílica assente;
10. Remover e descartar 500 µL do sobrenadante, sendo cuidadoso para evitar a matriz de ligação;
11. Ressuspender a matriz de ligação gentilmente na quantidade restante de sobrenadante. Transferir aproximadamente 600 µL da mistura para o Spin™ Filter e centrifugar a 14.000 x g por 1 minuto. Esvaziar o tubo de captura e adicionar o resto da mistura para no Spin™ Filter e centrifugar novamente. Esvaziar o tubo de captura novamente;
12. Adicionar 500 µL do preparado SEWS-M e gentilmente ressuspender o sedimento usando a força do líquido da ponta da pipeta;
13. Centrifugar a 14.000 x g por 1 minuto. Esvaziar o tubo de captura e repor;
14. Sem a adição de qualquer líquido, centrifugar uma segunda vez a 14.000 x g por 2 minutos para “secar” a matriz da solução residual limpa. Descartar o tubo de captura e repor com um novo;
15. Deixar o Spin™ Filter secar por 5 minutos à temperatura ambiente;
16. Suspende gentilmente a matriz de ligação (por cima do Spin™ Filter) em 50-100 µL de DES (DNase/Pyrogen-Free Water);
17. Centrifugar a 14.000 x g por 1 minuto para trazer o DNA eluído para o tubo de captura. Descartar o Spin™ Filter. O DNA agora está pronto para PCR e outras aplicações. Armazenar a -20°C por longos períodos ou 4°C até o uso.

Anexo F:

Tabela 1: Concentração de RNA (ng/ μ L) de tecido de brânquias e glândula digestiva de *Magallana gigas* e os respectivos rácios 260/230 e 260/280 para expressão genética.

Amostra	Concentração de RNA ng/ μ L	Rácio 260/230	Rácio 260/280
Brq controlo1 T24h	698,0	1,58	2,00
Brq controlo2 T24h	932,9	1,58	2,07
Brq controlo3 T24h	812,4	1,68	2,11
Brq infetada1 T24h	1200,2	1,62	2,03
Brq infetada2 T24h	1288,7	1,41	2,03
Brq infetada3 T24h	1613,6	1,38	2,11
Gland controlo1 T24h	1769,5	1,39	2,02
Gland controlo2 T24h	2583,0	1,32	1,98
Gland controlo3 T24h	2666,8	1,39	2,03
Gland infetada1 T24h	1802,1	1,39	2,03
Gland infetada2 T24h	801,0	1,30	2,07
Gland infetada3 T24h	2283,0	1,17	2,05

Tabela 2: Concentração de ADN (ng/ μ L) de tecido de brânquias e glândula digestiva de *Magallana gigas* e os respectivos rácios 260/230 e 260/280 para confirmação de *Amyloodinium ocellatum* nos tecidos por PCR.

Amostra	Concentração de ADN ng/ μ L	Rácio 260/230	Rácio 260/280
Brânquia Controlo	93,9	1,75	1,98
Brânquia Infetada	77,3	-3,44	1,93
Glândula Controlo	28,2	-1,05	2,26
Glândula Infetada	25,5	-1,31	2,44

Tabela 3: Valores dos trofontes de *Amyloodinium ocellatum* observados nas brânquias glândulas digestivas das ostras da espécie *Magallana gigas* nos respectivos momentos de amostragem.

TRAT	Brânquias			Glândula		
Réplica	1	2	3	1	2	3
CT0	12	10	3	1	3	1
CT0	3	7	6	2	0	1
CT0	4	5	5	2	6	3
CT0	7	9	7	2	6	4
CT0	1	2	4	4	6	7
CT0	10	13	10	1	1	2
IT96	13	20	9	2	9	6
IT96	9	15	9	1	0	0
IT96	8	23	10	3	0	1
IT96	22	17	10	3	0	0
CT96	19	10	16	1	0	0
CT96	6	11	2	0	1	1
CT96	5	3	6	0	0	0
CT168	13	3	4	1	3	2
CT168	8	5	6	1	1	0
CT168	6	2	4	2	2	0
IT168	1	1	3	1	3	1
IT168	3	1	1	0	0	0
IT168	1	2	7	0	0	0
IT168	3	2	2	1	1	0