

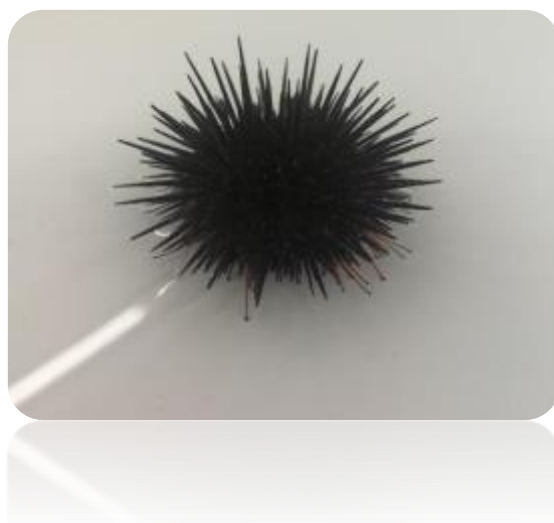
**Efeito da interação entre dietas e condições de  
aumento rápido de temperatura e amónia na resposta  
imune do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*  
(Lamarck, 1816)**



**Catarina Valente Lapa**



**Efeito da interação entre dietas e condições de  
aumento rápido de temperatura e amónia na resposta  
imune do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*  
(Lamarck, 1816)**



**Catarina Valente Lapa**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Especialista  
Teresa Maria Coelho Baptista e coorientação da Doutora Sílvia Alexandra  
Pereira Lourenço



**Efeito da interação entre dietas e condições de  
aumento rápido de temperatura e amónia na resposta  
imune do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*  
(Lamarck, 1816)**

Copyright © Catarina Valente Lapa  
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche  
Instituto Politécnico de Leiria, 2021

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



## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar a minha gratidão a todas as pessoas que passaram pelo meu percurso académico, principalmente a todas as pessoas que foram parte integrante desta dissertação através do seu apoio, conhecimento e incentivo!

Um grande agradecimento à minha orientadora Prof. Teresa Baptista e à minha coorientadora Doutora Sílvia Lourenço, que me acompanharam ao longo deste percurso e me permitiram obter muito mais conhecimento importante para a realização deste estudo. Muito obrigada pela disponibilidade, confiança, apoio constante, orientação e dedicação. Muito obrigada à professora Susana Mendes pela sua ajuda imprescindível na análise estatística deste estudo.

Muito obrigada aos Mestres Pedro Moreira e Ricardo Passos por toda a ajuda, disponibilidade e partilha de conhecimento na realização de toda a parte prática de aquacultura e laboratorial.

À minha família, namorado e amigos um enorme obrigada por todo o apoio nos momentos bons e maus, por todas as palavras de carinho e sabedoria, foram todos um grande incentivo e ajuda nesta grande etapa. Sem o vosso apoio e carinho este trabalho não seria possível. Por último tenho de agradecer à minha melhor amiga Beatriz Santos, por toda a ajuda, confiança, disponibilidade e amizade ao longo destes anos em Peniche. Este trabalho é dedicado a todos vocês que estiveram presentes neste percurso.



## Resumo

O ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) é um recurso marinho de elevado valor comercial, e as suas gónadas são muito apreciadas no sul da Europa. A sua sensibilidade a alterações nos parâmetros físico-químicos da água, leva à necessidade de entender os seus limites de tolerância em sistemas de produção aquícola. Sistemas estes onde os níveis de substâncias nocivas, tais como amónia, podem ser superiores às concentrações habituais em ambientes naturais. O sistema imunológico dos ouriços-do-mar é constituído por células imunes, os celomócitos. Estes são responsáveis pelas respostas celulares a agentes externos e produzem uma grande variedade de fatores humorais que são importantes defesas do hospedeiro contra patógenos. O presente trabalho tem como principal objetivo avaliar o efeito da dieta na resposta imune da espécie *P. lividus* expostos a fatores de stress ambiental. Os indivíduos foram recolhidos na zona intertidal de Peniche, foram mantidos em dois sistemas RAS de 600L e alimentados com duas dietas, macroalga (*Ulva rigida*) e ração vegetal, 3 vezes por semana durante 90 dias. Ao longo do ensaio nutricional, os indivíduos foram expostos a dois fatores de stress: temperatura elevada ( $\geq 24^{\circ}\text{C}$ ) e concentração elevada de amónia ( $\text{NH}_3 \geq 3 \text{ mg/L}$ ) em experiências de exposição aguda (EEA) de 24h. Após as EEA, foram avaliadas a resposta comportamental, a produção de células imunes e de moléculas com função imunológica como parâmetros de imunidade celular e humoral. No ensaio nutricional, os indivíduos alimentados com ração apresentaram um índice gonadosomático (12,50%) significativamente superior aos ouriços alimentados com a macroalga (3,53%), mas estados de maturação semelhantes. Nas EEA, as respostas de endireitamento variaram entre os 01:01 e os 03:13 minutos. Os indivíduos alimentados com a ração vegetal e sujeitos à amónia elevada apresentaram respostas mais rápidas em relação aos restantes parâmetros. Nos parâmetros de imunidade celular os granulócitos incolores foram os celomócitos mais abundantes (52%), seguidos dos fagócitos (31%), dos granulócitos vermelhos (12%) e das células vibráteis (2%). A contagem de células foi semelhante entre fatores, a dieta de macroalga promoveu percentagens mais elevadas de granulócitos incolores e vermelhos e mais baixas de fagócitos e vibráteis, a ração vegetal promoveu percentagens mais elevadas de fagócitos e granulócitos vermelhos e mais baixas de granulócitos incolores e vibráteis, quando comparados com o controlo. Nos parâmetros de resposta humoral, a concentração de lisozima variou entre 0,53 e 2,18  $\mu\text{g/mL}$ , sendo semelhante entre fatores e dietas. A atividade da protease variou entre 12 e 18%, esta

foi semelhante entre fatores, ambas as dietas promoveram percentagens mais baixas, quando comparados com o controlo e a concentração do óxido nítrico variou entre 0,14 e 2,59  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . Os ouriços-do-mar sujeitos à temperatura elevada apresentaram concentrações mais elevadas de óxido nítrico e estas só ocorreram na ração vegetal. Os resultados obtidos mostram que a dieta artificial parece favorecer os indicadores comportamentais e humorais dos ouriços expostos aos fatores. Já os indicadores de imunidade celular parecem mais dependentes da condição individual de cada ouriço.

Palavra-chave: Aquacultura; sistema imunológico; nutrição; invertebrados; celomócitos

## Abstract

The sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) is a highly valued marine resource and its gonads are highly appreciated in southern Europe. The sensitivity to changes in water quality drives the research to identify its tolerance limits in aquaculture systems. In these systems, the levels of harmful substances, such as ammonia, can often increase above the levels observed in their natural environment. The sea urchin's immune system is constituted by immune cells, the coelomocytes, and by a wide variety of humoral factors that are important host defences against pathogens, and responsible for cellular responses to external and specific agents. The main objective of this work is to evaluate the effect of diet on the immune response of *P. lividus* species exposed to environmental stress factors. The individuals were collected in the intertidal zone of Peniche, were kept in two RAS systems with 600L and fed with two diets, a macroalgae (*Ulva rigida*) and a vegetable dry feed, 3 times a week for 90 days. Throughout the nutritional trial, subjects were exposed to two stress factors: water temperature ( $\geq 24^{\circ}\text{C}$ ) and high ammonia concentration ( $\text{NH}_3 \geq 3 \text{ mg/L}$ ) in 24-hour acute exposure (EEA) experiments. After the EEA, the behavioral response, the production of immune cells and molecules with immune function as parameters of cellular and humoral immunity were evaluated. In the nutritional essay, the individuals fed with dry diet presented a gonadosomatic index (12,50%) significantly higher than the sea urchin's fed with the macroalgae (3,53%), but with similar maturity level. In the EEA, the rightening response varied between 01:01 and 03:13 minutes. Sea urchins fed with dry diet subjected to high ammonia exposed had faster responses in comparison to the other factors. For the cell immunity parameters, colorless granulocytes were the most abundant (52%), followed by phagocytes (31%), red granulocytes (12%) and vibrating cells (2%). Cell counts were similar between stress factors. The macroalgae diet promoted higher percentages of colorless and red granulocytes, lower percentages of phagocytes and vibratile. The vegetable feed promoted higher percentages of phagocytes and red granulocytes and lower percentages of colorless and vibratile granulocytes, when compared to the control. In the humoral response parameters, lysozyme concentration ranged between 0,53 and 2,18  $\mu\text{g/mL}$ , being similar between stress factors and diets. Protease activity ranged between 12 and 18%, with similar levels between factors. Both diets promoted lower protease percentages when compared to the control. The nitric oxide concentration ranged between 0,14 and 2,59  $\mu\text{M/mL}$  with the sea urchins fed with dry diet and under high temperature presenting the highest concentration of this humoral factor. The results

found showed that the dry diet seems to favour the behavioral and humoral indicators of sea urchin's exposed to the stress factors. The cellular immunity parameters seem more dependent on the individual condition of each sea urchin.

Keywords: Aquaculture; immunologic system; nutrition; invertebrates; coelomocytes

## Índice de matérias

1.	Introdução .....	1
1.1.	Biologia e morfologia da espécie.....	1
1.2.	Patologias e agentes promotores de doença .....	2
1.3.	Distribuição geográfica e ecologia da espécie.....	3
1.4.	Pescas e Aquacultura .....	5
1.5.	Dietas.....	7
1.5.1.	Macroalga .....	7
1.5.2.	Ração vegetal .....	7
1.6.	Fatores físico-químicos da qualidade da água .....	8
1.6.1.	Temperatura.....	8
1.6.2.	Amónia (NH <sub>3</sub> ) .....	9
1.7.	Sistema imunológico .....	10
1.8.	Parâmetros de resposta imune .....	11
1.8.1.	Parâmetros de imunidade celular .....	11
1.8.2.	Parâmetros de imunidade humoral.....	12
1.9.	Testes comportamental.....	14
1.10.	Objetivos.....	15
2.	Materiais e Métodos.....	15
2.1.	Recolha.....	15
2.2.	Sistema de Manutenção.....	15
2.3.	Aclimação .....	16
2.4.	Ensaio nutricional.....	17
2.5.	Experiências de exposição aguda a fatores de stress ambiental.....	19
2.6.	Amostragem.....	22
2.7.	Análise histológica .....	22
2.8.	Parâmetros de resposta humoral .....	23
2.8.1.	Lisozima .....	23
2.8.2.	Protease.....	24

2.8.3.	Óxido nítrico .....	24
2.9.	Análise estatística .....	25
2.9.1	Análise de Variância .....	25
2.9.1.1	Ensaio nutricional .....	25
2.9.1.2	Experiências de exposição aguda .....	25
2.9.2	Análise de componentes principais .....	26
3	Resultados .....	26
3.1	Ensaio nutricional .....	26
3.1.1	Indicadores morfométricos .....	27
3.1.2	Análise histológica .....	29
3.2	Experiências de exposição aguda a fatores de stress ambiental.....	32
3.2.1	Testes comportamentais .....	33
3.2.1.1.	Exposição aguda à temperatura elevada.....	34
3.2.1.2.	Exposição aguda a amónia elevada .....	35
3.2.2	Parâmetros de imunidade celular .....	37
3.2.2.1.	Exposição aguda a temperatura elevada.....	37
3.2.2.2	Exposição aguda a amónia elevada .....	39
3.2.3	Parâmetros de resposta humoral.....	42
3.2.3.1.	Concentração de Lisozima .....	42
3.2.3.1.1.	Exposição aguda a temperatura elevada .....	42
3.2.3.1.2.	Exposição aguda a amónia elevada.....	43
3.2.3.2	Atividade da Protease.....	45
3.2.3.2.1	Exposição aguda a temperatura elevada.....	45
3.2.3.2.2	Exposição aguda a amónia elevada.....	46
3.2.3.3	Produção de Óxido Nítrico .....	48
3.3	Correlação entre imunidade celular e humoral .....	49
3.3.1	Macroalga ( <i>Ulva rigida</i> ).....	49
3.3.2	Ração vegetal.....	50
4	Discussão .....	52

4.1	Ensaio nutricional.....	52
4.2	Experiências de exposição aguda a fatores de stress ambiental.....	55
4.2.1	Teste comportamental.....	55
4.2.2	Parâmetros de imunidade celular .....	57
4.2.3	Parâmetros de resposta humoral.....	60
4.3	Correlação entre imunidade celular e humoral .....	64
5	Conclusão .....	64
6	Referências.....	66
7	Anexo I.....	78

## Índice de figuras

Figura 1- Distribuição geográfica de ouriço-do-mar comum europeu *Paracentrotus lividus* (Fonte: <https://www.marlin.ac.uk/>). ..... 5

Figura 2- Representação esquemática dos sistemas aquáticos de recirculação, usados para manter os ouriços-do-mar da espécie *Paracentrotus lividus*, durante o período de aclimatação, durante 30 dias, e o ensaio nutricional, durante 90 dias (39 cm de profundidade, 82 cm de largura, 254 cm de comprimento). ..... 16

Figura 3- Desenho experimental adotado para as experiências de exposição aguda, durante 24h, a condições de temperatura elevada ( $\geq 24^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de amónia elevada ( $\geq 3 \text{ mg/L}$ ). O termo “Alga” e “Controlo alga” indica os tanques onde *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*) foram alocados, e o termo “Ração” e “controlo ração” indica os tanques onde os ouriços-do-mar alimentados com a Ração vegetal. .... 20

Figura 4 - Diâmetro médio ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal e avaliados nas três amostragens realizada ao longo do ensaio nutricional de 90 dias. T0 - amostragem inicial (N = 72); T1 - amostragem intermédia (N = 72); T2 – amostragem final (N = 72). ..... 27

Figura 5- Peso médio ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal avaliados nas três amostragem realizada ao longo do ensaio nutricional de 90 dias. T0 - amostragem inicial (N = 72); T1 - amostragem intermédia (N = 72); T2 – amostragem final (N = 72). Os símbolos \* representa diferenças estatisticamente significativas entre amostragens... 28

Figura 6- Índice gonadossomático médio ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal e avaliados nas três amostragens realizadas ao longo do ensaio nutricional, de 90 dias. T0 - amostragem inicial (N = 72); T1 - amostragem intermédia (N = 72); T2 – amostragem final (N = 72). Os símbolos <sup>a</sup> e <sup>b</sup> representam diferenças estatisticamente significativas entre amostragens. .... 29

Figura 7- Secções histológicas transversais representativas dos estados de maturação observados nas gónadas masculinas de *Paracentrotus lividus* ao longo do ensaio nutricional de 90 dias. **(A)** Estado I: Recuperação, testículo com uma pequena parede ascinal com espermatócitos e espermatogónios primários (ES) e fagócitos nutritivos (FN); **(B)** Estado II: Crescimento: testículos com colunas de espermatócitos em desenvolvimento a migrar para o centro (ME) e grande quantidade de fagócitos nutritivos (FN); **(C)** Estado III: testículo prematuro com espermatozóides (E), fagócitos nutritivos na periferia e espaços vazios (V); **(D)** Estado VI: Pós-desova, testículo após a desova com espaços vazios e alguns espermatozóides residuais (ER). Barra de escala: 100 $\mu\text{m}$ . ..... 30

Figura 8- Secções histológicas transversais representativas dos estados de maturação das gónadas femininas de *Paracentrotus lividus* observado ao longo do ensaio nutricional de 90 dias. **(A)** Estado I: Recuperação: reorganização da estrutura interna do ovário, oócitos previtelogénicos (OP) e fagócitos nutritivos (FN); **(B)** Estado II: Crescimento: ovário com oócitos vitelogénicos primários (OV), fagócitos nutritivos (FN) e núcleos visíveis (NV); **(C)** Estado III: Prematuro: oócitos vitelogénicos maiores (OV), fagócitos nutritivos (FN), núcleos visíveis (NV) e óvulos acumulados no lúmen e em espaços vazios (V). Barra de escala: 100 $\mu\text{m}$ . ..... 31

Figura 9- Distribuição dos estados de maturação dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*, nas três amostragens realizadas ao longo do ensaio nutricional (T0: amostragem inicial, N = 12; T1: amostragem intermédia, N = 12; e T2: amostragem final, N = 12). **A** - Grupo alimentado com macroalga (*Ulva rigida*) e **B** – Grupo alimentado com ração vegetal. Os estados de maturação da gónada foram classificados de acordo com Byrne, (1990): estado I- recuperação; estado II- crescimento; estado III- prematuro e estado VI- pós-desova. .... 32

Figura 10- Representação gráfica dos quatro tipos de células imunes do fluído celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. A seta branca indica os fagócitos; a seta azul indica os granulócitos incolores; a seta vermelha indica os granulócitos vermelhos e a seta preta indica as células vibráteis. Barra de escala: 50 µm. .... 33

Figura 11- Respostas de endireitamento ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* observadas após as experiências de exposição aguda ao aumento brusco de temperatura, realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional, de 90 dias. **A**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representa diferenças estatisticamente entre grupos experimentais. .... 35

Figura 12- Resposta de endireitamento ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* obtidas após as experiências de exposição aguda á concentração de amónia elevada realizadas no início (EEA0, N = 36) durante (EEA1, N = 36) e no fim (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional, de 90 dias. **A**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representa diferenças estatisticamente significativas entre grupos experimentais. .... 36

Figura 13- Percentagem das diferentes células imunes presentes no fluído celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*, após as experiências de exposição aguda a temperatura elevada realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36), e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. .... 39

Figura 14- Percentagem das diferentes células imunes presentes no fluído celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* após as experiências de exposição aguda a concentração elevada de amónia, obtidos no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. .... 41

Figura 15- Concentração de lisozima ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) no fluído celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* sujeitos às experiências de exposição aguda ao aumento brusco da temperatura realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A**: resultados obtidos com ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados obtidos com aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representam as diferenças estatisticamente significativas entre grupo exposto e grupo controlo. .... 43

Figura 16- Concentração de lisozima ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) determinada no fluído celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* após as experiências de exposição aguda a concentração elevada de amónia, realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias.

**A:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representa as diferenças estatisticamente significativas entre grupos expostos e grupo controlo..... 44

Figura 17- Atividade da protease (%) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) presente no fluído celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* após as experiências de exposição aguda a temperatura elevada, realizadas no início (T0, N = 36), durante (T1, N = 36) e no final (T2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representa as diferenças estatisticamente significativas entre amostragens. .... 46

Figura 18- Atividade da protease (%) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) presente no fluído celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* nas experiências de exposição aguda a concentração elevada de amónia realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. .... 47

Figura 19- Gráfico bidimensional de componentes principais da correlação entre parâmetros de imunidade celular e parâmetros de imunidade humoral utilizados para caracterizar a resposta imune dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*). Cada vetor representa um dos parâmetros analisados (percentagem de fagócitos- fag, percentagem de granulócitos incolores-Ginc, percentagem de granulócitos vermelhos-Gverm, percentagem de células vibráteis-vib, concentração de lisozima-lis e atividade da protease-pro) e cada ponto representa os grupos amostrais sujeitos a exposição aguda de temperatura (T) e controlo (CT) e concentração elevada de amónia (A) e controlo (CA) no início (T0), durante (T1) e final (T2) do ensaio nutricional de 90 dias. .... 50

Figura 20- Gráfico bidimensional de componentes principais da correlação entre parâmetros de imunidade celular e parâmetros de imunidade humoral utilizados para caracterizar a resposta imune dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a ração vegetal. Cada vetor representa um dos parâmetros analisados (percentagem de fagócitos- fag, percentagem de granulócitos incolores-Ginc, percentagem de granulócitos vermelhos-Gverm, percentagem de células vibráteis-vib, concentração de lisozima-lis e atividade da protease-pro) e cada ponto representa os grupos amostrais sujeitos a exposição aguda de temperatura (T) e controlo (CT) e concentração elevada de amónia (A) e controlo (CA) no início (T0), durante (T1) e final (T2) do ensaio nutricional de 90 dias. .... 51

## Índice de Tabelas

Tabela I - Valores médios ( $\pm$ desvio-padrão, DP) de temperatura, pH, salinidade, saturação de oxigénio, nitritos e amónia observados durante a aclimação durante 30 dias, nos tanques X e Y.....	16
Tabela II- Composição proximal (% DM), pigmentos carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ ) e perfil de ácidos gordos (g/100 g AG) das dietas de macroalga ( <i>Ulva rigida</i> ) e artificial (ração vegetal) utilizadas para alimentar <i>Paracentrotus lividus</i> durante o ensaio nutricional de 90 dias. Valores foram expressos como média $\pm$ DP.....	18
Tabela III - Valores médios ( $\pm$ desvio-padrão, DP) de temperatura, pH, salinidade, saturação de oxigénio, nitritos e amónia observados no ensaio nutricional de 90 dias, nos tanques X e Y. ....	19
Tabela IV- Valores médios ( $\pm$ desvio-padrão, DP) de temperatura, concentração de amónia, pH e saturação de oxigénio observados nas experiência de exposição aguda a fatores de stress ambiental, temperatura elevada e concentração de amónia elevada realizada ao longo do ensaio nutricional de 90 dias (EEA0, EEA1 e EEA2).....	21
Tabela V- Concentração de óxido nítrico ( $\mu\text{M/mL}$ ) ( $\pm$ desvio-padrão, DP) no fluido celómico dos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> alimentados com macroalga ( <i>Ulva rigida</i> ) e com ração vegetal e sujeitos a experiências de exposição aguda a temperatura elevada realizadas no início (T0, N = 36), durante (T1, N = 36) e no final (T2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias.....	48
Tabela VI- Concentração de óxido nítrico ( $\mu\text{M/mL}$ ) ( $\pm$ desvio-padrão, DP) no fluido celómico dos ouriços-do-mar <i>Paracentrotus lividus</i> alimentados com macroalga ( <i>Ulva rigida</i> ) e com ração vegetal e sujeitos experiências de exposição aguda a concentração elevada de amónia realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. ....	48



## 1. Introdução

### 1.1. Biologia e morfologia da espécie

O ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) pertence ao filo Echinodermata, classe Echinoidea e ordem Echinoidea (Lawrence, 2007). O nome equinoderme é derivado das palavras gregas *echinos* (espinhoso) e *derma* (pele) que significa pele espinhosa e tem sido a denominação original para os ouriços-do-mar, uma vez que é a sua principal característica externa. Os equinodermes são invertebrados exclusivamente marinhos, classificados como organismos bentônicos, ou seja, habitam o fundo marinho (Zito *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2020).

Internamente, os equinodermes contêm apenas sistema digestivo (ou tubo intestinal), sistema reprodutivo (as gónadas), e um sistema nervoso primitivo, todos envolvidos por um endosqueleto dérmico esférico, duro e calcário. Os ouriços-do-mar não possuem sistema respiratório ou circulatório especializado, nenhum coração, nenhum vaso sanguíneo ou órgão excretor especializado (Mortensen *et al.*, 2012).

O endosqueleto de *P. lividus* é levemente achatado, formado por placas calcárias, cobertas por espinhos. Na parte externa do esqueleto estão os espinhos, pés ambulacrários e pedicelários (Mortensen *et al.*, 2012). O esqueleto possui ossículos localizados na derme, cada ossículo consiste numa rede tridimensional de trabéculas mineralizadas, delimitando uma rede interna e complementar preenchida por tecido conjuntivo, o estroma (Asnaghi *et al.*, 2018). As placas de calcite são presas umas às outras através de ligamentos enrolados que envolvem as hastes de calcite, juntando assim as placas adjacentes. As trabéculas projetam-se de uma placa para os orifícios nas placas adjacentes, interligando as placas (Collard *et al.*, 2015; Asnaghi *et al.*, 2018). Na fase oral do exosqueleto encontra-se o aparelho de mastigação, denominado de lanterna de Aristóteles.

*Paracentrotus lividus* é uma espécie gonocórica sem dimorfismo sexual externo (Byrne, 1990). Só é possível distinguir entre macho e fêmea por meio da observação da libertação de gâmetas ou por análise microscópica das gónadas. Estudos histológicos das gónadas de *P. lividus* indicam um único ciclo gametogénico anual (Byrne, 1990; Martínez *et al.*, 2003), com a maturação a ser favorecida por temperaturas da água do mar entre 18 e 22°C e por um fotoperíodo curto (Shpigel *et al.*, 2004). O desenvolvimento embrionário é indireto marcado por uma metamorfose no fim da fase larvar. Após a fecundação, o embrião dá origem a uma larva planctónica com simetria bilateral. No decurso do desenvolvimento larval, o plano corporal pentarradial comum do adulto começa a desenvolver-se com o surgimento no lado esquerdo da larva de uma estrutura

auxiliar, o rudimento (Haesaerts *et al.*, 2003). Quando o rudimento está bem desenvolvido, a larva sofre metamorfose transformando-se num juvenil bentónico. Os juvenis assemelham-se a versões em miniatura dos adultos, possuindo já todas as características do equinoderme adulto. No entanto, imediatamente após a metamorfose, carecem, por vezes de um trato digestivo funcional, boca e ânus (Gosselin & Jangoux, 1998).

Os ouriços-do-mar da espécie *P. lividus* apresentam uma grande variedade de cores, incluindo preto-roxo, roxo, vermelho-castanho, castanho-escuro, amarelo-castanho, castanho-claro ou verde-azeitona. O diâmetro (medido no eixo horizontal e excluindo os espinhos) dos maiores indivíduos pode chegar aos 8 cm (Boudouresque *et al.*, 2001; Boudouresque & Verlaque, 2020).

### **1.2. Patologias e agentes promotores de doença**

Os equinodermes, especialmente as classes Echinoidea e Ophiuroidea, fazem parte da dieta de muitos peixes e crustáceos. Portanto, as doenças em equinodermes merecem ser investigadas biologicamente e ecologicamente (Jangoux, 1984). Estas doenças podem ser causadas por agentes bióticos, tais como microrganismos, ou por agente abióticos, tais como diversos poluentes e outros fatores físico-químicos (e.g., alterações no pH ambiental) que produzem deformações no corpo destes organismos (Jangoux, 1984; Beck *et al.*, 2014). A multiplicação de bactérias ou vírus patogénicos e a transmissão subsequente de doenças associada às temperaturas de produção elevadas é responsável pela mortalidade em massa das espécies cultivadas (Hu *et al.*, 2021).

As doenças de origem biótica podem ser causadas por microrganismos (ex: bactérias, fungos e cianobactérias), protozoários (ex.: flagelados, esporozoários, ciliados) e metazoários (ex.: mesozoa, parazoa, cnidária, turbelária, trematoda e nematoda). As doenças causadas por microrganismos geralmente provocam lesões no esqueleto, enquanto as doenças provocadas por protozoários e metazoários tendem a causar lesões nas gónadas (Jangoux, 1987).

As principais doenças em ouriços-do-mar são causadas por microrganismos, sendo a doença do ouriço-do-mar calvo a que tem causado mais episódios de mortalidade em massa em diversas espécies ao longo do tempo (Jangoux, 1987).

Esta doença é causada por vários microrganismos, ocorrendo da seguinte forma: (1) aparência da epiderme verde em torno de algumas bases do esqueleto; (2) perda de espinhos e outros apêndices (pés ambulacrários e pedicelários) e ocorrência de

coloração verde na epiderme e tecido dérmico subjacente; (3) perda da epiderme e do tecido dérmico superficial e formação de pequenas áreas desnudadas circulares e alongadas no esqueleto; (4) destruição parcial da camada superior do esqueleto (Jangoux, 1987). Curiosamente, acredita-se que a doença do ouriço-do-mar calvo não seja fatal, a menos que o esqueleto esteja excessivamente danificado, permitindo a entrada de bactérias na cavidade celómica (Sweet, 2020).

Existem diversos registos da ocorrência de epidemias associadas à doença ouriço-do-mar calvo. O primeiro registo ocorreu em 1971 no oceano Pacífico (Califórnia), seguido de 1979 no mar Mediterrâneo (França), em 1983 nas Caraíbas, em 2009 ao largo da costa do México e em 2009 – 2010 na ilha da Madeira e nas Canárias (Beck *et al.*, 2014; Feehan & Scheibling, 2014; Gizzi *et al.*, 2020).

Esta não foi a única doença a afetar várias espécies de ouriços, incluindo *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus* e *Diadema antillarum*, mas foi a mais marcante, pois levou a uma grande devastação dos seus stocks naturais. Outras doenças que também tiveram um grande impacto foram a paramoebiasis (*Paramoeba invadens*) entre 1980 e 2012 (Nova Escócia) e uma doença causada pelo nematode (*Echinomermella matsi*) em 1983 (Noruega) (Feehan & Scheibling, 2014).

Os ouriços-do-mar que habitam em águas costeiras e estuarinas, estão positivamente expostos a microrganismos potencialmente patogénicos e desenvolveram respostas de defesa baseadas principalmente na ação de células de resposta imune, ou imunócitos, e de fatores humorais contidos no fluído celómico. As propriedades morfológicas e funcionais dos imunócitos ainda são controversas e os mecanismos da sua ação são, em parte, desconhecidos (Arizza *et al.*, 2007).

### **1.3. Distribuição geográfica e ecologia da espécie**

O ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* distribui-se por todo o Mar Mediterrâneo e no Atlântico Nordeste, da Escócia e Irlanda ao sul de Marrocos e Ilhas Canárias, incluindo os Açores e Madeira (Figura 1).

É particularmente comum em regiões onde as temperaturas da água do mar variam entre 10°C e 15°C no inverno e entre 18°C e 25°C no verão, como as que ocorrem no Mediterrâneo Ocidental, na costa de Portugal e no Golfo da Biscaia. No Canal da Mancha, temperaturas abaixo dos 4°C e acima dos 29°C são letais. No entanto, nas lagoas costeiras do Mediterrâneo, podem suportar temperaturas superiores a 30°C, o que sugere um certo nível de adaptação fisiológica (Yeruham *et al.*, 2015; Boudouresque & Verlaque, 2020).

Esta espécie habita o intertidal e o subtidal, em poças rochosas intertidais e desde o limite inferior médio da baixa-mar até profundidades entre os 10 e 20 m. Em condições mais expostas, estes organismos resistem ao deslocamento pelas ondas por escavação no substrato (por exemplo, arenito, calcário, granito, basalto, mas não ardósia dura), criando cavidades em forma de copo onde vivem permanente ou temporariamente. Este comportamento também pode fornecer proteção contra predadores. As cavidades oferecem o ajuste perfeito para os animais, sendo tão numerosas e tão próximas que o substrato fica completamente em forma de favo de mel (Boudouresque & Verlaque, 2013).

Os ouriços-do-mar da espécie *P. lividus* são bastante comuns em todas as suas faixas geográficas e de profundidade e as densidades das suas populações podem variar entre algumas dezenas até centenas de indivíduos por metro quadrado ( $\text{ind}\cdot\text{m}^{-2}$ ) (Girard *et al.*, 2011; Boudouresque & Verlaque, 2013).

As mudanças nas comunidades de ouriços-do-mar são impulsionadas tanto por fatores bióticos como abióticos, e também por pressões humanas (Boudouresque & Verlaque, 2013).

Como animais herbívoros, os ouriços-do-mar desempenham um importante papel ecológico, e sua capacidade de alterar os estados da comunidade de algas tornou-os objeto de vários estudos ecológicos (Einer & Vadas, 1990; Tegner & Dayton 2000; Girard *et al.*, 2011).

Embora *P. lividus* não seja um organismo sésil, os seus movimentos são realizados numa área muito pequena. Esta característica aliada à sua longevidade (8-9 anos para atingir um tamanho comercial de 5 cm), tornam os ouriços-do-mar um excelente bioindicador da qualidade do ecossistema (Sala & Zabala, 1996; Branco *et al.*, 2013; Fernandez-Boo *et al.*, 2018). Portanto, elevadas taxas de mortalidade associadas a doenças e epidemias pode ter consequências ecológicas importantes que afetam a estrutura e função da comunidade bentónica. Além disso, infeções podem aumentar sua vulnerabilidade à predação e causar mudanças na sua distribuição e frequência de tamanho (Girard *et al.*, 2011).



Figura 1- Distribuição geográfica de ouriço-do-mar comum europeu *Paracentrotus lividus* (Fonte: <https://www.marlin.ac.uk/>).

#### 1.4. Pescas e Aquacultura

As gónadas do ouriço-do-mar são muito apreciadas em várias partes do mundo, especialmente no sul da Europa, o que faz com que os ouriços-do-mar sejam um recurso alimentar de elevado valor económico (Baião *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2021). *Loxechinus albus* e *Strongylocentrotus spp.* são as espécies mais exploradas em todo o mundo, enquanto *P. lividus* é a espécie mais explorada e comercialmente mais importante nas costas atlântica e mediterrânea, nomeadamente em França, Espanha e Itália, onde as suas gónadas são consideradas uma iguaria (Boudouresque & Verlaque, 2013; Prato *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020). França é o maior consumidor de ouriços-do-mar na Europa com cerca de 1.000 toneladas por ano (Andrew *et al.*, 2002) e o maior importador com cerca de 200 toneladas em 2015 (Pais *et al.*, 2007; FAO, 2016; Castilla-Gavilán *et al.*, 2019).

O preço médio do ouriço-do-mar é estável em torno de 5 €/Kg, com um preço final, ovas limpas frescas, variando de 60 a 80 €/Kg, dependendo da variabilidade da colheita anual (Carboni *et al.*, 2012; Prato *et al.*, 2018). Estima-se que o mercado global dos ouriços-do-mar transacione aproximadamente 60 000 a 70 000 toneladas anualmente (Stefánsson *et al.*, 2017).

A crescente procura pelas gónadas de ouriços-do-mar resultou num declínio acentuado das suas populações em muitos países europeus (Bertocci *et al.*, 2014; Casal *et al.*, 2020). As causas positivas deste declínio são a apanha intensiva, a pesca ilegal e a gestão pesqueira ineficiente (Ghisaura *et al.*, 2016; Prato *et al.*, 2018). Como causas

inpositivas, podem apontar-se a intensificação da urbanização da orla costeira e as alterações climáticas, nomeadamente o aquecimento global. Estas pressões associadas à atividade humana, modificaram fortemente os ambientes marinhos costeiros (Bertocci *et al.*, 2018; Ouréns *et al.*, 2014; Yeruham *et al.*, 2015).

No norte de Portugal, a apanha comercial de *P. lividus* só começou recentemente para satisfazer a procura do mercado de regiões vizinhas, tais como a Galiza (Espanha), onde a sobre-exploração resultou em reduções drásticas dos stocks locais (Bertocci *et al.*, 2013).

A crescente preocupação com os impactos económicos e ecológicos da sobre-exploração das populações de *P. lividus* na Península Ibérica e em outras regiões levaram à implementação recente de medidas de gestão tais como limites de capturas, redução do número de licenças concedidas, e a definição de um tamanho mínimo legal de indivíduos capturados (Bertocci *et al.*, 2018).

Os ouriços-do-mar produzidos em aquacultura (criação para o mercado) ou aprimoramento das ovas (captura de adultos selvagens para aumento do tamanho e qualidade das ovas) representam atualmente menos de 0,01% das cerca de 75 000 toneladas de ouriços vendidos anualmente em todo o mundo (James *et al.*, 2017). Neste contexto, a aquacultura de ouriços-do-mar tem-se desenvolvido nas últimas décadas, principalmente na China, Japão, Rússia, Noruega e Irlanda (FAO, 2016).

Na aquacultura de ouriços-do-mar europeia, *P. lividus* é a espécie mais desejada, e está associada a uma extensa pesquisa científica desde o início de 1990 (Grosjean *et al.*, 1998; Shpigel *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020). Apesar disso, há ainda a necessidade de superar alguns obstáculos existentes, como baixas taxas de crescimento. Portanto, é crucial compreender melhor a fisiologia dos ouriços-do-mar e, assim, maximizar o crescimento somático, controlar o desenvolvimento reprodutivo e a qualidade das gónadas, a fim de garantir o cultivo de alto valor no menor tempo possível.

A sensibilidade dos ouriços-do-mar às mudanças na qualidade da água e à incapacidade de manter a homeostasia interna tornam crucial definir os limites de sua tolerância à qualidade da água em sistemas de aquacultura. A definição destes limites é particularmente importante para a cultura intensiva, onde os níveis de substâncias nocivas, nomeadamente compostos azotados, podem ser superiores às concentrações que normalmente ocorrem em ambientes naturais (Andrew *et al.*, 2002; Mortensen *et al.*, 2012; Albrizio *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020).

## 1.5. Dietas

### 1.5.1. Macroalga

As algas pertencentes ao género *Ulva*, comumente conhecidas como alfaces-do-mar, são amplamente distribuídas ao longo das costas dos oceanos do mundo. Hoje em dia, são utilizadas em aplicações farmacêuticas e químicas, bem como na produção de biocombustíveis. Estas tornaram-se nutricionalmente importantes, devido às suas propriedades (proteínas, minerais e vitaminas) e pelo seu papel na resposta ao stress e resistência a doenças (Rato *et al.*, 2018) e são utilizadas na aquacultura como alimento fresco para peixes, camarões, moluscos e outras espécies de herbívoros. As espécies do género *Ulva* são bastante consumidas por ouriços-do-mar (Cyrus *et al.*, 2014; Onomu *et al.*, 2020) e são amplamente utilizadas como alimentos frescos na criação de *P. lividus* (Shpigel *et al.*, 2005 e 2006; Brundu & Chindris, 2018; Shpigel *et al.*, 2018).

A coloração laranja das gónadas dos ouriços-do-mar deve-se principalmente à deposição de pigmentos carotenóides, particularmente equinenona que é sintetizada no tubo digestivo, a partir do  $\beta$ -caroteno. Quando os ouriços-do-mar são alimentados com dietas artificiais, frequentemente produzem gónadas de grandes dimensões, mas com coloração mais amarelada. Dietas naturais ou a suplementação de dietas artificiais com  $\beta$ -caroteno de fontes naturais, tal como o pigmento derivado da microalga (*Dunaliella salina*) pulverizada nos *pellets*, resulta na intensificação da cor das gónadas muito melhor do que utilizando  $\beta$ -caroteno sintético ou astaxantina (Shpigel *et al.*, 2005).

Em aquacultura, taxas de crescimento elevadas e imunidade individual podem depender do equilíbrio entre nutrientes e da utilização de um suplemento dietético adequado. As algas têm recebido cada vez mais atenção não só por causa da sua qualidade nutricional elevada, mas também pelos seus componentes biologicamente ativos. *Ulva spp.* enriquecida foi recomendada como alimento adequado para *Haliotis tuberculata*, *Haliotis discus hannai* e *Haliotis roei* (Dang *et al.*, 2011).

### 1.5.2. Ração vegetal

Ouriços-do-mar alimentados com dietas secas, têm geralmente uma taxa de alimentação menor do que indivíduos alimentados com algas com base no peso húmido, mas não com base no peso seco. A ração vegetal promove um maior crescimento gonadal em relação a um alimento natural e tem o potencial para ser usada na aquacultura de ouriços-do-mar (Leite, 2019).

Em algumas espécies de ouriços-do-mar, o crescimento gonadal provou ser mais rápido com rações formuladas em comparação com diferentes espécies de algas

(Sartori & Gaion, 2015). Por isso, o uso de macroalgas pode ser comercialmente inviável na forma de uma dieta pura para a produção comercial de ouriços-do-mar. Em contraste, alguns vegetais, que podem estar constantemente disponíveis, podem ser vistos como uma alternativa potencial. Muitas fontes alternativas de alimentação têm sido estudadas para promover o crescimento gonadal e para manipular o ciclo gametogénico para obter um estágio de desenvolvimento desejável para comercialização (Raposo *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020).

O nível de lípidos assim como a sua qualidade nutricional nas dietas artificiais pode ser crucial para o normal funcionamento metabólico. Embora os ouriços-do-mar possam sintetizar ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA), por exemplo 20: 4n-6 (ácido araquidónico, ARA) e 20: 5n-3 (ácido eicosapentaenóico, EPA), a partir dos seus precursores, o linoleico (18: 2n-6, LA) e linolénico (18: 3n-3, ALA), respetivamente, todos esses ácidos gordos essenciais (AGE) devem ser fornecidos na dieta para melhorar o crescimento (Baião *et al.*, 2019).

A composição de ácidos gordos da dieta é refletida nos tecidos de ouriço do mar, por exemplo, os fosfolípidios da dieta parecem ser principalmente metabolizados e armazenados como lípidos neutros no intestino e gónadas, afetando a qualidade das mesmas (Baião *et al.*, 2019).

Baião *et al.*, (2019) exploraram dois níveis de proteína e dois de lípidos, mostrando que a dieta com teor de proteína de 30% MS e de teor lipídico de 6% MS resultam num maior rendimento de gónadas. Mas, de acordo com Zupo *et al.*, (2018) dietas com nível de proteína entre 40 e 47% e teor de gordura de 10% garantiram o maior crescimento e índice gonadossomático. Por outro lado, Carboni *et al.*, (2015) avaliaram três níveis de proteína na dieta entre 17% e 22% em detrimento de gordura e carboidratos, resultando em percentagens de proteína: energia (P:E) na dieta entre 11 e 14 mg P/kJ. Lourenço *et al.*, (2020) refere que estes autores concluíram que a dieta com maior nível de proteína melhorou o crescimento somático sem afetar significativamente o índice gonadossomático.

## **1.6. Fatores físico-químicos da qualidade da água**

### **1.6.1. Temperatura**

Os efeitos dos fatores ambientais sobre a fisiologia foram documentados para uma variedade de invertebrados marinhos, incluindo diversas espécies de equinodermes (Wang *et al.*, 2008). Entre estes fatores, podem ser nomeados a temperatura e a salinidade, cujo grau de influência depende ainda do nível de exposição às marés a que estes organismos estão sujeitos.

A temperatura desempenha um papel central nos processos biológicos de todos os organismos, uma vez que esta afeta as reações enzimáticas. Um aumento moderado da temperatura pode provocar alterações na taxa metabólica de um organismo, resultando em alterações em processos biológicos, tais como crescimento e reprodução. Na verdade, todas as espécies vivem dentro um intervalo ótimo de temperatura, para além do qual variações significativas deste fator podem ter efeitos negativos na fisiologia dos organismos (Branco *et al.*, 2013).

Na ausência de restrições alimentares, a temperatura representa a variável abiótica mais importante para os ouriços-do-mar. Esta controla taxas de crescimento somático e gonadal e também desenvolvimento larvar (Shpigel *et al.*, 2004; Yeruham *et al.*, 2018). Por este motivo, o estudo do efeito do aumento da temperatura da água do mar no sistema imunológico será extremamente útil para compreender os mecanismos pelos quais o aquecimento global afeta os ouriços-do-mar (Delorme & Sewell, 2016). Por outro lado, as condições ambientais têm sido correlacionadas com a incidência de doenças. Sabe-se que a temperatura elevada promove a ocorrência de doenças nos ouriços-do-mar e reduz a sua resistência a patógenos (Girard *et al.*, 2011).

### **1.6.2. Amónia (NH<sub>3</sub>)**

Os ouriços-do-mar excretam ureia, que é decomposta pelas bactérias ureolíticas em amónia (Siikavuopio *et al.*, 2004). A amónia é um constituinte comum dos ambientes aquáticos, sendo um subproduto primário da degradação da matéria orgânica rica em nitrogénio realizada por bactérias heterotróficas, e um catabolito de organismos aquáticos que excretam iões amónio. Em solução aquosa esta está presente em duas formas, ionizada (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e não ionizada (NH<sub>3</sub>), representada pela equação de equilíbrio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O ↔ NH<sub>3</sub> + H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>). Neste equilíbrio, as percentagens relativas de NH<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dependem principalmente da temperatura e do pH e, em menor grau, da salinidade (Arafa *et al.*, 2006).

Destas duas formas, a espécie NH<sub>3</sub> é tóxica para os organismos heterotróficos e a sua concentração no meio aumenta com o aumento da temperatura e do pH e diminui com salinidades elevadas. Se NH<sub>3</sub> é a espécie tóxica de amónia na água do mar, é importante saber como é que a sua concentração é influenciada pelas variações dessas condições (Bower & Bidwell, 1978; Basuyaux & Mathieu, 1999; Arizzi *et al.*, 2003; Siikavuopio *et al.*, 2004).

Em sistemas de aquacultura intensivos, a concentração de amónia pode aumentar até níveis que podem causar a redução das taxas de crescimento ou até a morte de

qualquer espécie cultivada (Arafa *et al.*, 2006). Liu & Chen, (2004) demonstraram que concentrações elevadas de amónia afetam o crescimento, mudas, consumo de oxigénio e excreção deste metabolito no camarão *Litopenaeus vannamei*. Esta afetou também a resposta imune dos camarões *Litopenaeus stylirosyris* e *Macrobrachium rosenbergii* (Liu & Chen, 2004).

É, por isso, vital que o limite de tolerância além do qual uma espécie experimenta distúrbios fisiológicos e crescimento reduzido seja determinado. Alguns estudos indicam que concentrações superiores a  $1 \text{ mg N} - \text{NH}_{3-4} \text{ L}^{-1}$  têm um efeito negativo na ingestão de alimentos e na taxa de crescimento de *P. lividus* (Basuyaux & Mathieu, 1999; Siikavuopio *et al.*, 2004). Porém, o efeito de elevadas concentrações de amónia no sistema imune nesta espécie não foi ainda avaliado.

### **1.7. Sistema imunológico**

O sistema imunológico inato dos equinodermes é dividido em duas categorias: imunidade celular e imunidade humoral. As células do sistema imunológico destes organismos são denominadas de celomócitos e são responsáveis pelas respostas celulares a agentes externos, como a fagocitose, encapsulação, citotoxicidade e produção de peptídeos antimicrobianos (Arizza *et al.*, 2013; Pinsino & Matranga, 2015). Além disso, uma grande variedade de fatores humorais, importantes na defesa do hospedeiro contra patógenos, são secretados pelos celomócitos e por células epiteliais incluindo lectinas, peptídeos antimicrobianos, enzimas lisossomais, inibidores de protease, aglutininas, lisinas e citocinas e podem ser encontrados no fluido celómico dos equinodermes (Canicatti, 1991; Ramírez-Gómez & García-Arrarás, 2010; Soudant & Volety, 2013; İzzetoğlu *et al.*, 2013; Fernandez-Boo *et al.*, 2018). O fluido celómico tem um pH muito ácido (pH = 7,6) em comparação com a água do mar (pH 8,2) (Lewis *et al.*, 2016), protegendo ouriços do mar contra a proliferação de patógenos (Arizza *et al.*, 2013; Fernandez-Boo *et al.*, 2018). De facto, estes animais desenvolveram mecanismos moleculares complexos para utilizar em diversos processos biológicos, como comunicação, defesa, reprodução e resistência antimicrobiana (Luparello *et al.*, 2020).

Os invertebrados representam cerca de 95% das espécies animais, e são comuns em todos os tipos de ambientes, onde estão sujeitos a uma grande variedade de fatores físicos, químicos e biológicos de grande amplitude, incluindo um microbiota complexo que representa um mecanismo adicional de defesa contra potenciais patógenos (Canesi & Procházková, 2013).

A ausência de imunidade adquirida e a incapacidade de produzir anticorpos (resposta específica) não significa falta de especificidade. Os invertebrados desenvolveram mecanismos genéticos capazes de produzir milhares de proteínas diferentes com apenas um pequeno número de genes. Esta diversidade permite que eles reconheçam e eliminem uma ampla gama de diferentes patógenos. Outros fatores, como adaptação ambiental e longevidade dos invertebrados, representam fontes adicionais de informação (Canesi & Procházková, 2013).

## **1.8. Parâmetros de resposta imune**

### **1.8.1. Parâmetros de imunidade celular**

No fluido celômico (FC) podem ser observados quatro tipos de células morfológicamente distintas: fagócitos (amebócitos fagocíticos), granulócitos (células esféricas) vermelhos e incolores, e células vibráteis (Arizza *et al.*, 2007). Em ouriços-do-mar saudáveis, o FC é estéril (Wardlaw & Unkles, 1978). Esta esterilidade é mantida pela propriedade bactericida do FC e pelos celomócitos que fagocitam organismos estranhos e partículas. Quando o FC infecciona, os ouriços-do-mar sucumbem rapidamente à doença (Sweet *et al.*, 2016).

A ação dos celomócitos inclui a fagocitose de detritos celulares, a indução ou incremento das respostas celulares e a ajuda na cicatrização de feridas, o acúmulo de células e a formação de cápsulas em redor do corpo ou composto estranho (Matranga, 1996; Hibino *et al.*, 2006; Arizza *et al.*, 2007; Smith., 2010; Branco *et al.*, 2013; İzzetoğlu *et al.*, 2013). As moléculas imunológicas segregadas pelas células imunes incluem lectinas, hemolisinas, citocinas, a família de proteínas complementares e antimicrobianos que têm sido alvo de extensa pesquisa, incluindo potenciais aplicações médicas (Gross *et al.*, 1999; Ramírez-Gómez & García-Arrarás, 2010; Smith, 2010; Stabili *et al.*, 2018).

Os fagócitos têm a capacidade de fagocitar partículas estranhas e são capazes de formar grandes coágulos, com um núcleo excêntrico redondo ou em forma de feijão num vasto citoplasma cercado por uma enorme membrana. Há duas categorias de fagócitos, dependendo de sua morfologia e tamanho, os petalóides e os filopodiais, cujas diferenças morfológicas refletem a diferença na sua migração e função (Matranga *et al.*, 2006; Piryaei *et al.*, 2018).

As células vibráteis têm corpos celulares esféricos com muitas vesículas, um único flagelo longo e podem nadar rapidamente através do fluido. Especula-se sobre a

existência de uma ampla variedade de funções para este tipo de célula, mas nenhuma foi verificada. (Matranga *et al.*, 2006; Piryaei *et al.*, 2018).

Os dois tipos de células esféricas são de tamanho semelhante, preenchidas com grandes vesículas que são incolores ou vermelhas. As células vermelhas contêm um pigmento denominado equinocromo A, este possui atividade antimicrobiana (Matranga, 2005; Matranga *et al.*, 2006; Piryaei *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2019; Inguglia *et al.*, 2020).

Alterações ambientais de temperatura, salinidade, exposição ao ar, pH da água do mar e oxigênio dissolvido (hipoxia e anoxia), assim como alterações nas concentrações de amônia e nitritos têm demonstrado reduzir significativamente a atividade fagocítica (Ellis *et al.*, 2011). Além disso, a atividade fagocítica é significativamente reduzida por uma série de agentes antropogênicos, tais como distúrbios mecânicos relacionados com a aquacultura e poluição por contaminantes (Ellis *et al.*, 2011). Embora a atividade fagocítica se mostre sensível a mudanças, este parâmetro imune também demonstra variação sazonal natural causada por alterações na fisiologia do organismo (Fernandez-Boo *et al.*, 2018).

### **1.8.2. Parâmetros de imunidade humoral**

A lisozima, é uma enzima lítica que ataca bactérias gram-positivas e que está presente em vários tecidos de animais e plantas, funciona como um defensor do sistema imune inato contra patógenos bacterianos (Zhao *et al.*, 2007). Esta enzima foi identificada em órgãos de maior risco de infecção bacteriana tais como rim, baço, trato digestivo e muco da epiderme em animais. O stress e doenças afetam a produção de lisozima nos indivíduos (Shimizu, 1999).

Shimizu, (1999) sugere que a lisozima esteja envolvida no sistema de defesa biológica através da atividade bactericida. Segundo Zhao *et al.*, (2007), para fins defensivos e nutricionais, era de esperar que a lisozima produzida pelo sistema imune dos moluscos possuísse capacidade digestiva para além do efeito bactericida que esta tem nas células procarióticas.

As proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos e podem desempenhar um papel funcional em tecidos colágenos mutáveis, um tipo de tecido que tem recebido atenção considerável em equinodermes devido à sua capacidade de sofrer alterações reversíveis nas suas propriedades mecânicas (Zabel *et al.*, 2006). Os inibidores de protease são conhecidos por desempenhar papéis importantes na imunidade dos invertebrados. Estes regulam a atividade da protease envolvida na coagulação da hemolinfa, na ativação da profenoloxidase e na síntese de

citocinas e peptídeos antimicrobianos. Além disso, muitos inibidores de protease protegem os hospedeiros ao inativar positivamente as proteases de patógenos, visto que as proteases são importantes fatores de virulência. Existe informação limitada sobre os inibidores de protease em moluscos marinhos, incluindo em espécies de bivalves comercialmente importantes (Xue *et al.*, 2009).

Proteases e lisozimas desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa dos invertebrados (Fernandez-Boo *et al.*, 2018). Estas foram previamente descritas em equinodermes e representam uma barreira contra a proliferação de bactérias devido à sua atividade peptidase (Gross *et al.*, 1999). Também a presença de contaminantes pode comprometer o estado imunológico dos ouriços-do-mar. A presença de altas concentrações de zinco (Zn) e produtos químicos usados para fins agrícolas, como o lindano, diminuí a produção de lisozima e, conseqüentemente, a atividade bactericida que pode aumentar a suscetibilidade a uma infecção (Gross *et al.*, 1999; Fernandez-Boo *et al.*, 2018). A exposição ao Cobre (Cu) estimulou os principais parâmetros imunológicos, nomeadamente a lisozima de ameijoas e ostras, levando ao aumento do número de hemócitos circulantes (Ivanina *et al.*, 2016).

O óxido nítrico (ON) é um gás altamente reativo e lábil produzido pela conversão enzimática de L-arginina por sintases de óxido nítrico (SON) (Romano *et al.*, 2011). O ON atua como um mediador na sinalização de múltiplas vias celulares e regula um amplo espectro de funções biológicas como a neuro transmissão, defesas do hospedeiro, fluxo sanguíneo e relaxamento muscular nos mamíferos (Zhu, 2020). O ON foi proposto como uma molécula que responde a estímulos exógenos tóxicos sendo considerado um sinal celular de stress ambiental em ouriços-do-mar. A combinação de ON com superóxido aniônico produzido na explosão respiratória pode gerar peroxonítrico (ONOO<sup>-</sup>), que também possui poder oxidante e atividade citotóxica. Fernandez-Boo *et al.*, (2018) e Johnstone *et al.*, (2019) sugerem que os celomócitos são capazes de produzir e libertar ON e que este é um mediador químico que foi conservado como arma de defesa do hospedeiro ao longo do tempo evolutivo.

Os papéis biológicos do ON em invertebrados marinhos são múltiplos e estão relacionadas com a alimentação, defesa, stress ambiental, comportamentos fisiológicos, metamorfose, natação, simbiose, agregação de hemócitos e regulação da pressão arterial. Nas esponjas *Axinella polypoides* e *Petrosia ficiformis*, o ON é um sinal celular de stress ambiental. No cnidário *Aiptasia diaphana*, o ON está envolvido nas células urticantes especializadas presentes nos tentáculos que têm uma variedade de funções, geralmente na defesa ou captura de espécies de presas. Na medusa *Aglantha digitale*,

o ON regula a natação, e atua também em fases posteriores de desenvolvimento. É ainda um inibidor endógeno da metamorfose no caracol marinho *Ilyanassa obsoleta* e na ascídia *Cnemidocarpa finmarkiensis* e também um inibidor da fertilização no ouriço-do-mar *Lytechinus pictus* (Palumbo, 2005).

### **1.9. Testes comportamental**

Fatores como a disponibilidade de alimento, predação, correntes e ondas, substrato e topografia podem afetar o comportamento do ouriço-do-mar. Dumont *et al.*, (2007) relataram que os ouriços-do-mar se movem em direções aleatórias, na maioria das vezes, até detetar uma fonte de alimento. A sobrevivência depende fortemente da capacidade destes migrarem entre áreas de alimentação expostas e abrigos fornecidos pela estrutura do habitat, como fendas rochosas, buracos ou cobertura da flora marinha (Cohen-Rengifo *et al.*, 2018 Brundu *et al.*, 2020).

Os comportamentos neuromusculares dos equinodermes tais como, como cobrir-se com pequenas pedras, conchas ou algas, a resposta de endireitamento e o reflexo de lanterna de Aristóteles são importantes para sua aptidão, mas também afetam o ecossistema marinho através dos efeitos nas suas presas, predadores e competidores (Ling & Johnson, 2012; Brothers & McClintock, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

O comportamento de cobertura refere-se à capacidade que os ouriços-do-mar têm de utilizar os pés ambulacrários e espinhos para mover objetos, como conchas, pedras e fragmentos de algas, para colocar na sua superfície aboral. Os comportamentos de cobertura e abrigo fornecem proteção contra a radiação solar e contra a predação (Dumont *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2017). Coletivamente, esses comportamentos fornecem uma indicação geral do bem-estar geral durante a exposição às mudanças ambientais (Brothers & McClintock, 2015).

A resposta de endireitamento é a capacidade de coordenar os pés ambulacrários e os movimentos dos espinhos para se endireitar em relação ao substrato quando se encontra com a face oral virada para cima. Esta correção da postura é muito importante para os ouriços-do-mar escaparem de predadores e de turbulências físicas (Brothers & McClintock, 2015; Zhang *et al.*, 2017).

O reflexo da lanterna de Aristóteles demonstra a capacidade de um indivíduo de manipular as suas mandíbulas para agarrar um alimento (Brothers *et al.*, 2015).

Hernández, *et al.*, (2004), reportaram que os ouriços-do-mar expostos a diferentes temperaturas (principalmente temperaturas perto dos limites inferior e superior do

intervalo ótimo), apresentam alterações comportamentais, tais como, a perda de espinhos e a redução da movimentação no tanque. Estudos empíricos indicam que uma temperatura elevada da água afeta opostamente a fisiologia, imunidade, crescimento, desenvolvimento da gónada, desenvolvimento larval e comportamental dos equinodermes em águas intertidais e zonas rochosas (Zhang *et al.*, 2017).

### **1.10. Objetivos**

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito de duas dietas, uma dieta de macroalga e uma ração vegetal, na resposta imune dos ouriços-do-mar da espécie *P. lividus*. Para avaliar este efeito, os ouriços-do-mar foram sujeitos a duas condições ambientais extremas no início, durante e no fim do ensaio nutricional de forma a ativar a resposta imune nestas condições. Nas três experiências, a resposta imune foi medida através de indicadores comportamentais (resposta de endireitamento), indicadores de imunidade celular (contagens diferenciais de celomócitos) e parâmetros de imunidade humoral (quantificação de lisozima, protease e óxido nítrico).

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Recolha**

Foram recolhidos 228 ouriços-do-mar da espécie *P. lividus* com diâmetros entre 33 e 49 mm (excluindo os espinhos), na zona intertidal da praia de Porto Batel, Peniche, Portugal (39° 19.354' N, 9° 21.548' W) no dia 16 de outubro de 2020. Os ouriços-do-mar foram recolhidos manualmente e colocados em geleiras, cheias com água do mar da zona de recolha, e arejamento para minimizar o stress dos indivíduos durante o transporte para o laboratório de Aquacultura do MARE - Politécnico de Leiria (Peniche, Portugal). De seguida, os indivíduos foram cuidadosamente limpos removendo pequenos fragmentos de alga e pequenas pedras retidos nos espinhos, e posteriormente foram colocados aleatoriamente em tanques retangulares com 39 cm de profundidade, 82 cm de largura, 254 cm de comprimento e com um volume de 600 L.

### **2.2. Sistema de Manutenção**

No período de aclimação e no ensaio nutricional, os sistemas onde os ouriços-do-mar foram mantidos são semelhantes. Cada tanque (600L) estava montado em sistema de recirculação (RAS) equipado com um tanque SUMP (250L), uma resistência de aquecimento de 230 V (EHEIM GmbH & Co. Germany), filtração mecânica (lã e filtros de esponja), filtração biológica através do uso de bio bolas, um escumador V2Skim Pro 900 U (Tropical Marine Centre, United Kingdom) e uma bomba de água Hailea HX-6530 (Guangdong Hailea Group Co., Ltd., Guangdong, China) (Figura 2).

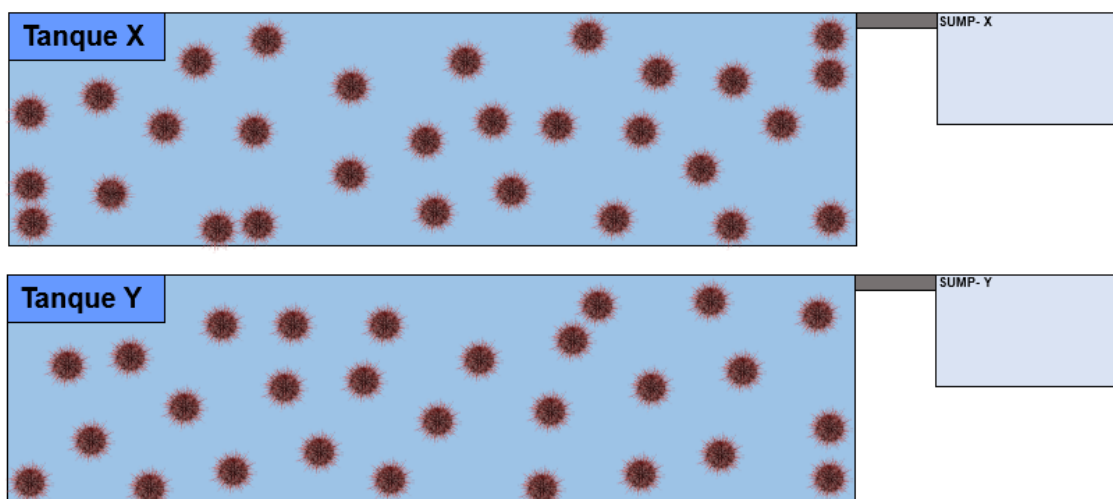


Figura 2- Representação esquemática dos sistemas aquáticos de recirculação, usados para manter os ouriços-do-mar da espécie *Paracentrotus lividus*, durante o período de aclimação, durante 30 dias, e o ensaio nutricional, durante 90 dias (39 cm de profundidade, 82 cm de largura, 254 cm de comprimento).

### 2.3. Aclimação

A aclimação teve início no dia da recolha a 16 de outubro de 2020, com uma duração de 30 dias. Os ouriços-do-mar foram distribuídos aleatoriamente pelos tanques (N = 114 indivíduos/tanque) e não foram alimentados durante este período. A temperatura média da água durante o período de aclimação foi de  $19,0 \pm 2^\circ\text{C}$  em ambos os tanques. Os tanques foram limpos sempre que necessário, e regularmente foram realizadas pequenas trocas de água, de aproximadamente 50L (20% do volume total do tanque SUMP). A monitorização dos parâmetros da qualidade da água foi realizada com uma sonda multiparamétrica YSI Professional Plus (YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA) para temperatura ( $^\circ\text{C}$ ), pH, salinidade (ppm) e saturação de oxigénio (%), e de kits comerciais de determinação de  $\text{NH}_3$  e  $\text{NO}_2$  (Salifert, Holland). Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água durante o período de aclimação estão representados na Tabela I.

Tabela I - Valores médios ( $\pm$  desvio-padrão, DP) de temperatura, pH, salinidade, saturação de oxigénio, nitritos e amónia observados durante a aclimação durante 30 dias, nos tanques X e Y.

	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	pH	Salinidade (ppm)	saturação de oxigénio (%)	Nitritos (mg/L)	Amónia (mg/L)
Tanque X	$19,41 \pm 1,09$	$8,08 \pm 0,06$	$32,99 \pm 0,37$	$86,06 \pm 2,49$	$0,29 \pm 0,21$	$0,19 \pm 0,13$
Tanque Y	$19,51 \pm 1,27$	$8,11 \pm 0,04$	$33,43 \pm 0,70$	$85,71 \pm 2,27$	$0,25 \pm 0,20$	$0,19 \pm 0,13$

## 2.4. Ensaio nutricional

Antes do início do ensaio nutricional, todos os ouriços-do-mar foram medidos, pesados e distribuídos de forma aleatória pelos dois tanques. O ouriços-do-mar dos tanques X e Y apresentaram um peso médio de  $27,44 \pm 6,35$  g e  $27,07 \pm 5,56$  g e um diâmetro médio de  $39,72 \pm 3,47$  mm e  $39,84 \pm 2,94$  mm, respetivamente. A cada tanque foi alocada uma das dietas selecionadas de acordo com o desenho experimental da Figura 2, sendo a macroalga para o tanque X e a ração vegetal para o tanque Y. O ensaio nutricional teve início no dia 16 de novembro de 2020 com uma duração de 90 dias.

Os indivíduos foram alimentados 3 vezes por semana, com as duas dietas distintas:

- Uma dieta natural à base da macroalga, *Ulva rigida*. Esta alga é produzida em aquicultura multitrófica integrada pela empresa ALGApplus Lda (Portugal). A macroalga foi adquirida seca e antes de ser fornecida aos ouriços-do-mar foi reidratada com água do mar. A quantidade de alimento fornecido em cada alimentação correspondia a 5% da biomassa total do tanque (determinada após a pesagem de todos os ouriços);
- Uma dieta artificial, a ração vegetal, formulada com ingredientes à base de plantas e cereais fabricada pela empresa SPAROS, Lda. (Olhão, Portugal). A formulação da ração vegetal (VG) incluiu farelo de soja, proteína de soja e glúten de trigo como ingredientes. Para atender algumas das necessidades nutricionais específicas de *P. lividus*, esta ração foi suplementada com vitamina C (750 mg/Kg) e E (1800 mg/Kg), fosfato monocalcico, carbonatos, silicatos e  $\beta$ -caroteno (100 mg.Kg<sup>-1</sup>). A quantidade de alimento a fornecer inicialmente, foi calculada tendo em conta a taxa de ingestão voluntária dos ouriços de  $0,60 \pm 0,04$  g/dia (Lourenço *et al.*, 2021).

Em ambos os tanques, a quantidade de alimento a fornecer foi ajustada ao longo do ensaio nutricional de acordo com a ingestão voluntária e a biomassa total de cada tanque. A composição nutricional e de ácidos gordos das duas dietas encontra-se descrita na Tabela II.

Tabela II- Composição proximal (% DM), pigmentos carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ ) e perfil de ácidos gordos (g/100 g AG) das dietas de macroalga (*Ulva rigida*) e artificial (ração vegetal) utilizadas para alimentar *Paracentrotus lividus* durante o ensaio nutricional de 90 dias. Valores foram expressos como média  $\pm$  DP.

	<i>Ulva rigida</i>	Ração vegetal
<b>Composição Proximal (% DM)</b>		
<b>Matéria seca (%)</b>	91,85 $\pm$ 0,29	95,13 $\pm$ 0,12
<b>Proteína</b>	18,12 $\pm$ 0,1	31,32 $\pm$ 0,40
<b>lípidos</b>	1,93 $\pm$ 0,04	9,39 $\pm$ 0,47
<b>Hidratos de Carbono</b>	22,25 $\pm$ 0,67	45,85 $\pm$ 1,70
<b>Cinzas</b>	26,00 $\pm$ 0,29	13,09 $\pm$ 0,21
<b>Pigmentos Carotenoides (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>		
<b>Luteína</b>	65,01 $\pm$ 0,31	19,51 $\pm$ 0,36
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	4,25 $\pm$ 0,09	vestígios
<b>Perfil de ácidos Gordos (g/100 g AG)</b>		
C14	0,84 $\pm$ 0,15	8,35 $\pm$ 0,25
C15	0,23 $\pm$ 0,10	0,59 $\pm$ 0,02
C16	46,90 $\pm$ 1,47	32,15 $\pm$ 0,13
C17	0,80 $\pm$ 1,03	0,43 $\pm$ 0,01
C18	0,38 $\pm$ 0,08	6,66 $\pm$ 0,36
C20	n.d	0,38 $\pm$ 0,05
C21	0,49 $\pm$ 0,26	n.d
C22	2,00 $\pm$ 0,48	n.d
C23	0,53 $\pm$ 0,38	0,06 $\pm$ 0,05
C24	0,20 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,03
<b><math>\Sigma</math> AG saturados</b>	<b>57,17 <math>\pm</math> 0,53</b>	<b>48,66 <math>\pm</math> 0,18</b>
C14:1n5	1,17 $\pm$ 1,48	n.d
C15:1n5	3,51 $\pm$ 0,60	0,15 $\pm$ 0,01
C16:1n7	2,87 $\pm$ 1,18	6,66 $\pm$ 0,11
C17:1n7	0,44 $\pm$ 0,40	0,15 $\pm$ 0,03
C18:1n9	11,94 $\pm$ 4,29	29,74 $\pm$ 0,23
C20:1n9	n.d	0,81 $\pm$ 0,04
C20:1n11	8,35 $\pm$ 1,40	n.d
C22:1	0,33 $\pm$ 0,26	n.d
C24:1n9	0,14 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02
<b><math>\Sigma</math> AG Monoinsaturados</b>	<b>28,75 <math>\pm</math> 1,31</b>	<b>37,55 <math>\pm</math> 0,38</b>
C16:3n3	0,25 $\pm$ 0,02	n.d
C16:4n1	0,47 $\pm$ 0,07	n.d
C18:2n6	2,35 $\pm$ 0,31	10,73 $\pm$ 0,05
C18:3n6	0,33 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,03
C18:3n3 (ALA)	7,92 $\pm$ 1,35	0,43 $\pm$ 0,02
C20:3n6	0,11 $\pm$ 0,004	n.d
C20:3n3 + C20:4n6	0,52 $\pm$ 0,53	n.d
C20:5n3 (EPA)	0,24 $\pm$ 0,27	0,29 $\pm$ 0,25
C22:2n6	0,32 $\pm$ 0,09	n.d
C22:5n3	1,24 $\pm$ 0,15	n.d
C22:6n3 (DHA)	0,34 $\pm$ 0,14	n.d
<b><math>\Sigma</math> AG Polinsaturados</b>	<b>14,08 <math>\pm</math> 1,85</b>	<b>11,48 <math>\pm</math> 0,28</b>

As rotinas, trocas de água e monitorização dos parâmetros da qualidade da água foram realizadas de acordo com a mesma metodologia adotada para o período de aclimação. Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água durante o ensaio nutricional são apresentados na tabela III.

Tabela III - Valores médios ( $\pm$  desvio-padrão, DP) de temperatura, pH, salinidade, saturação de oxigénio, nitritos e amónia observados no ensaio nutricional de 90 dias, nos tanques X e Y.

	Temperatura (°C)	pH	Salinidade (ppm)	Saturação de oxigénio (%)	Nitritos (mg/L)	Amónia (mg/L)
Tanque X	19,98 $\pm$ 0,64	8,26 $\pm$ 0,07	33,62 $\pm$ 0,34	83,50 $\pm$ 2,27	0,12 $\pm$ 0,19	0,25 $\pm$ 0,00
Tanque Y	20,00 $\pm$ 0,76	8,23 $\pm$ 0,06	33,65 $\pm$ 0,34	82,83 $\pm$ 2,16	0,50 $\pm$ 0,51	0,25 $\pm$ 0,00

## 2.5. Experiências de exposição aguda a fatores de stress ambiental

As experiências de exposição aguda (EEA), foram realizadas em três fases durante o ensaio nutricional: Em novembro no início de ensaio nutricional (EEA0); em Janeiro após 1 mês e meio do início do ensaio nutricional (EEA1); em fevereiro no fim do ensaio nutricional (EEA2). Em cada experiência, os ouriços-do-mar foram expostos, durante 24 horas, a duas condições ambientais extremas: um aumento brusco da temperatura em 5°C, para 24 ( $\pm$  0,6)°C e da concentração de amónia (NH<sub>3</sub>)  $\geq$  3 mg/L.

A temperatura da água de 24°C foi obtida através do aquecimento dos 5 L de água em cada um dos tanques (capacidade total de 12 L) com uma resistência de aquecimento (EHEIM GmbH & Co., Alemanha).

A concentração de amónia  $\geq$  3 mg/L na água foi obtida através da dissolução de cloreto de amónia (NH<sub>4</sub>Cl) no meio ambiente. Para cada tanque, cerca de 70 mg de NH<sub>4</sub>Cl foram diluídos em 5L de água-do-mar. Para realização destes cálculos teve-se em conta que cada ouriço produz 0,30 mg/L de amónia em 24 horas. Após estes procedimentos os ouriços foram colocados aleatoriamente nos tanques.

A concentração de amónia na água dos tanques foi confirmada por análise espectrofotométrica através do método de azul indofenol para determinação de amónia em águas naturais (Ivančić & Degobbis, 1984). A cada amostra de 1 mL de água foram adicionados 40  $\mu$ L de solução de fenol 5% (m/v) em etanol 95%, 100  $\mu$ L de solução oxidante (iguais volumes de solução de ácido dicloroisocianurico 0,04% e solução alcalina de citrato) e 40  $\mu$ L de solução nitroprussido 0,05% (m/v). As amostras incubaram durante 1 h à temperatura ambiente em total escuridão e as alíquotas de 200

µL foram transferidas para microplacas 96 x 96 e a absorvância medida a 635 nm num espectrofotómetro de microplacas (Synergy H1 Hybrid Reader Biotek® Winooski, USA). A concentração de amónia nas amostras foi obtida por extrapolação dos valores de absorvância de uma curva de calibração de 0, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µmol/L.

Em cada EEA, foram escolhidos de forma aleatória 3 ouriços-do-mar por dieta e colocados em tanques de vidro (capacidade total de 12 L) com 5 L de água e com arejamento constante, de acordo com as condições definidas à priori, temperatura  $\geq 24$  °C (N = 3 tanques) e controlo à temperatura ambiente (N = 3 tanques) e amónia  $\geq 3$  mg/L (N = 3 tanques) e controlo sem adição de amónia (N = 3). O desenho experimental adotado para cada uma das EEA está esquematizado na Figura 3. Os ouriços-do-mar foram expostos durante 24 horas às condições selecionadas para cada tanque. Durante este período, a temperatura da água e o oxigénio dissolvido em cada tanque foram monitorizados com um oxímetro Handy Polaris (OxyGuard International A/S, Dinamarca). Os restantes parâmetros de qualidade da água foram monitorizados durante os três tempos de exposição com a sonda de pH sympHony SP70P (VWR, Estados Unidos da América) e kits de testes comerciais (Salifert, Holanda). Os valores médios dos parâmetros físico-químicos em cada EEA são apresentados na Tabela IV. Durante as EEA, não foram realizadas trocas de água e os ouriços-do-mar não foram alimentados. Após 24 horas os ouriços foram retirados dos tanques, amostrados e procedeu-se à contagem e identificação das células existentes no FC.

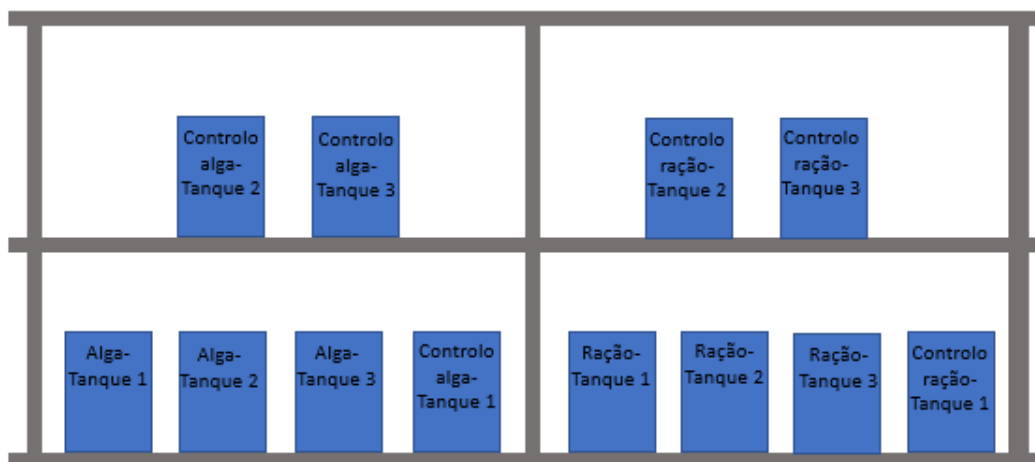


Figura 3- Desenho experimental adotado para as experiências de exposição aguda, durante 24h, a condições de temperatura elevada ( $\geq 24^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de amónia elevada ( $\geq 3$  mg/L). O termo "Alga" e "Controlo alga" indica os tanques onde *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*) foram alocados, e o termo "Ração" e "controlo ração" indica os tanques onde os ouriços-do-mar alimentados com a Ração vegetal.

Tabela IV- Valores médios ( $\pm$  desvio-padrão, DP) de temperatura, concentração de amónia, pH e saturação de oxigénio observados nas experiência de exposição aguda a fatores de stress ambiental, temperatura elevada e concentração de amónia elevada realizada ao longo do ensaio nutricional de 90 dias (EEA0, EEA1 e EEA2).

EEA inicial (T0)							
Fator	Temperatura			Amónia			
Dieta	Temperatura (°C)	saturação de oxigénio (%)		Amónia (mg/L)	Temperatura (°C)	saturação de oxigénio (%)	
<b>Alga</b>	24,4 $\pm$ 0,10	82,90 $\pm$ 1,40		2 - 4	19,5 $\pm$ 0,20	82,07 $\pm$ 1,53	
<b>Ração</b>	24,3 $\pm$ 0,15	93,13 $\pm$ 1,21		2 - 4	20,0 $\pm$ 0,25	84,47 $\pm$ 1,00	
<b>Controlo Alga</b>	20,2 $\pm$ 0,35	92,33 $\pm$ 0,76		0,00	20,2 $\pm$ 0,35	92,33 $\pm$ 0,76	
<b>Controlo Ração</b>	20,3 $\pm$ 0,20	90,40 $\pm$ 2,86		0,00	20,3 $\pm$ 0,20	90,40 $\pm$ 2,86	
EEA intermédia (T1)							
Fator	Temperatura			Amónia			
Dieta	Temperatura (°C)	Saturação de oxigénio (%)	pH	Amónia (mg/L)	Temperatura (°C)	Saturação de oxigénio (%)	pH
<b>Alga</b>	24,6 $\pm$ 0,20	84,30 $\pm$ 0,96	8,29 $\pm$ 0,02	3,96	16,6 $\pm$ 0,06	88,13 $\pm$ 4,61	8,18 $\pm$ 0,01
<b>Ração</b>	24,5 $\pm$ 0,06	85,13 $\pm$ 1,86	8,21 $\pm$ 0,01	4,60	16,7 $\pm$ 0,06	93,63 $\pm$ 1,25	8,12 $\pm$ 0,06
<b>Controlo Alga</b>	19,5 $\pm$ 0,92	86,80 $\pm$ 3,21	8,18 $\pm$ 0,02	0,00	16,9 $\pm$ 0,15	92,67 $\pm$ 1,26	8,11 $\pm$ 0,02
<b>Controlo Ração</b>	19,3 $\pm$ 1,12	92,97 $\pm$ 1,80	8,14 $\pm$ 0,06	0,00	16,7 $\pm$ 0,21	92,43 $\pm$ 4,62	8,20 $\pm$ 0,03
EEA final (T2)							
Fator	Fator Temperatura			Fator Amónia			
Dieta	Temperatura (°C)	Saturação de oxigénio (%)	pH	Amónia (mg/L)	Temperatura (°C)	Saturação de oxigénio (%)	pH
<b>Alga</b>	24,2 $\pm$ 0,20	81,43 $\pm$ 1,59	8,15 $\pm$ 0,08	4,42	18,3 $\pm$ 0,06	88,50 $\pm$ 1,06	8,15 $\pm$ 0,01
<b>Ração</b>	24,2 $\pm$ 0,20	81,43 $\pm$ 1,59	8,15 $\pm$ 0,08	4,49	18,2 $\pm$ 0,06	88,63 $\pm$ 1,51	8,11 $\pm$ 0,06
<b>Controlo Alga</b>	22,2 $\pm$ 0,31	82,93 $\pm$ 1,50	8,20 $\pm$ 0,02	0,00	18,3 $\pm$ 0,62	88,60 $\pm$ 0,62	8,19 $\pm$ 0,02
<b>Controlo Ração</b>	22,1 $\pm$ 0,36	82,10 $\pm$ 0,66	8,11 $\pm$ 0,01	0,00	18,3 $\pm$ 0,10	88,77 $\pm$ 1,03	8,09 $\pm$ 0,05

## 2.6. Amostragem

Após cada EEA, foram realizados testes comportamentais aos ouriços. Estes foram colocados com a região aboral voltada para baixo, e foi contabilizado o tempo que estes demoraram até retornarem à sua posição normal. Após este teste, foram recolhidos 1mL de FC através da membrana peristomial de cada indivíduo, com auxílio de uma agulha hipodérmica (MicroTip 25G- 0,5x16 mm) estéril inserida numa seringa de 5mL com 1mL solução anticoagulante (2 mM de EGTA- 0,0764 g, 40 mM de HEPES- 0,9591 g, 1M de NaCl- 5,8429 g e 1mM de MgCl<sub>2</sub> - 0,0929 g diluídos em 100mL de água ultrapura). As amostras de FC foram colocadas em microtubos de 2mL mantidos em gelo, e logo de seguida retirada uma amostra de 10µL para identificar e contar os diferentes celomócitos presentes no FC ao microscópio (Zeiss, Axio LAb.A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha), a uma ampliação de 400x, com o auxílio de uma câmara de Neubauer (Marienfeld, Alemanha). As restantes amostras foram armazenadas em gelo para evitar degradação pelo calor. Os ouriços-do-mar foram, de seguida, pesados (peso total húmido de cada indivíduo, ± 0,01 g), o seu diâmetro medido (exceto espinhos) com uma craveira (± 0,1 mm de precisão) e dissecados através de uma incisão circular ao longo da membrana peristomial. As gónadas foram removidas cuidadosamente com uma pequena espátula, limpas e pesadas numa balança analítica (± 0,01 g) Adam PGL 3002 (Adam Equipment co. Ltd, Milton Keynes, Reino Unido) para o cálculo do índice gonadossomático (IG):

$$IG = \frac{\text{Peso húmido da gónada (g)}}{\text{Peso húmido total (g)}} * 100$$

Em cada EEA (EEA0, EEA1 e EEA2), foram amostrados 72 ouriços-do-mar, e foi recolhida uma gónada de 12 ouriços por cada dieta para posterior análise histológica do estágio de maturação.

No final da amostragem as amostras de FC foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) a 4°C. O sobrenadante foi recolhido sem o precipitado para novos eppendorfs, devidamente identificados, e congelados a -80°C para posterior avaliação dos parâmetros humorais da resposta imune.

## 2.7. Análise histológica

Foi realizada a análise histológica das gónadas recolhidas nas EEA. Estas foram fixas numa solução de formalina a 4% por 48h. Após este período, as gónadas foram transferidas para uma solução de etanol 70% e armazenadas. Posteriormente, as

amostras foram desidratadas no processador automático de tecido Leica® TP1020 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), com submersões sequenciais em etanol graduado (80%, 96% e 100%), seguido de xileno para limpeza e impregnação com parafina a 60°C. Subsequentemente, as amostras foram embebidas em parafina (Leica® EG 1120 dispensador de parafina com placa quente integrada; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) bloqueadas e cortadas em secções de 5 µm, utilizando um micrótomo rotativo Accu-Cut® SRM™ 200 (Sakura Finetek Europa BV, Holanda).

As secções foram coradas com solução de hematoxilina de Harris (Scharlab S.L., Sentmenat, Barcelona, Espanha) e eosina Y (VWR International, Leuven, Bélgica). A hematoxilina cora os núcleos das células de azul para azul/preto, enquanto a contra coloração de eosina demonstra a arquitetura histológica geral. A eosina distingue entre diferentes tipos de tecidos conjuntivos, por meio de coloração em vários tons de laranja, rosa e vermelho. As lâminas foram analisadas por microscopia com uma ampliação de 400x, acoplado com uma câmara (AxioCam MRc3 S/N 4524 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Alemanha) e o software de análise de imagem (Zeiss, Zen 2.6 lite (blue edition), Göttingen, Alemanha). Posteriormente as amostras foram classificadas de acordo com o estudo de Byrne, (1990), onde são descritos seis estados de maturação das gónadas: estágio I (recuperação); estágio II (em crescimento); estágio III (prematuro); estágio IV (maturo); estágio V (desova) e estágio VI (pós-desova).

## **2.8. Parâmetros de resposta humoral**

### **2.8.1. Lisozima**

Para quantificar concentração de lisozima no FC foi seguido o ensaio turbidimétrico descrito por Fernández-Boo *et al.*, (2018). Foram preparadas duas soluções, um tampão de hidrogenofosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,05M pH 6,2, e uma solução de *Micrococcus lysodeikticus* (0,5 mg/L) (Sigma M3770-5g). Após a preparação das soluções, foram colocados 50 µL de FC livre de células em microplaca de 96 poços (Greiner 96 flat bottom), utilizou-se como controlo positivo 300 µL de suspensão bacteriana (*Micrococcus lysodeikticus*) e como controlo negativo 300 µL de solução tampão. A absorvância das amostras foi medida a 25°C e comprimento de onda (λ) de 450 nm, aos 0 e aos 5 minutos num espectrofotómetro de microplacas EPOCH 2 (BioTek Instruments, Inc., Estados Unidos da América).

A curva padrão foi realizada através da diluição em série de 13 soluções de concentrações decrescentes de lisozima HEWL (Hen egg white lysozyme) com um tampão de sódio fosfato (0,05M, pH = 6,2): 20, 0 µg/mL; 10 µg/mL; 5 µg/mL; 2,5 µg/mL;

1,125 µg/mL; 0,625 µg/mL; 0,3125 µg/mL; 0,1563 µg/mL; 0,078 µg/mL; 0,0391 µg/mL; 0,0195 µg/mL; 0,0098 µg/mL; 0,0049 µg/mL. A absorvância das soluções padrão foi lida a 450 nm aos 00:30 min e 4:30 minutos. E a quantidade de lisozima em cada amostra foi calculada através da fórmula da curva padrão e comparada com as absorvâncias da curva de calibração. Os resultados são apresentados em µg/mL.

### **2.8.2. Protease**

Para quantificar a atividade da protease no FC foi utilizado o ensaio de hidrólise da azocaseína de acordo com Fernández-Boo *et al.*, (2018). Foi adicionado 50 µL de FC livre de células a um microtubo eppendorf com 60 µL de tampão fosfato-salino (PBS) e 125 µL de azocaseína a 2% num tampão de bicarbonato de amónio 100 mM. De seguida as amostras foram incubadas durante 24h à temperatura ambiente, em agitação. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e as amostras foram centrifugadas a 10 000 × g durante 10 min. Posteriormente, 100 µL de cada amostra foram transferidos para microplacas de 96 poços (Greiner 96 flat bottom), em duplicado e adicionou-se 100 µL de NaOH 1N. A densidade ótica foi lida a  $\lambda = 450$  nm utilizando o espectrofotómetro de microplacas EPOCH 2. O controlo positivo (bicarbonato de amónio e tripsina) representa 100% da atividade da protease e como controlo negativo (bicarbonato de amónio) que representa (0% da atividade da protease). Os resultados são apresentados em percentagem (%).

### **2.8.3. Óxido nítrico**

Para quantificar o teor de óxido nítrico no FC foi seguido o procedimento da reação de Griess de acordo com (Fernández-Boo *et al.*, 2018). Foram preparadas três soluções para este procedimento, a solução de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a 2,5%, a solução de sulfanilamida a 1% em  $H_3PO_4$  e a solução de N-naftiletlenodiamina a 0,1% em  $H_3PO_4$ . Posteriormente, em triplicado, foram colocados 25 µL de sobrenadante e 100 µL de 1% de sulfanilamida (Sigma) em 2,5% de ácido fosfórico nas microplacas (Greiner 96 flat bottom), seguido por 100 µL de 0,1% de N-naftil-etilenodiamina (Sigma) em ácido fosfórico 2,5%, como controlo negativo utilizou-se 25 µL de água destilada. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica foi determinada utilizando o espectrofotómetro de microplacas.

A curva padrão foi realizada através da preparação de várias soluções de nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ), 9 pontos com concentrações decrescentes (0,1 M, 0,01 M, 1 mM, 0,5 mM, 0,05 mM, 0,025 mM, 0,0025 mM, 1,25 µM, 0,125 µM) e a concentração de óxido nítrico nas amostras foi determinada a partir da reta padrão. A densidade ótica foi lida a

$\lambda = 450$  nm utilizando o espectrofotômetro de microplacas EPOCH 2. Os resultados são apresentados em  $\mu\text{M/mL}$ .

## 2.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa IBM SPSS™ para Windows, versão 27 (IBM Corporation, Armonk, Nova Iorque, Estados Unidos da América). Os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio-padrão (DP), e as diferenças entre grupos experimentais foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância  $\alpha = 5\%$  ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

### 2.9.1 Análise de Variância

#### 2.9.1.1 Ensaio nutricional

De forma a avaliar diferenças no diâmetro e no peso dos ouriços-do-mar comparando as duas dietas (dois níveis: macroalga e ração vegetal), ao longo do ensaio nutricional (três níveis: T0, T1 e T2), foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores ( $F_{(\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupos})} = F$  valor;  $p\text{-value}$ ). Quando necessário foram realizadas comparações múltiplas utilizando o teste de diferença mínima significativa post-Hoc Tukey (HSD) ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

De forma a avaliar o efeito da interação do fator dieta e o momento de amostragem (T) no índice gonadosomático, foi realizada uma ANOVA a dois fatores ( $F_{(\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupos})} = F$  valor;  $p\text{-value}$ ). Perante o não cumprimento do pressuposto da homogeneidade ( $F_{(\text{graus de liberdade})} =$  valor; nível de significância  $p$ ) entre grupos de amostragens, os resultados foram analisados independentemente para cada dieta analisando o efeito do momento de amostragem (T) através da ANOVA a um fator ( $F_{(\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupos})} = F$  valor;  $p\text{-value}$ ). Perante o não cumprimento da homogeneidade de variâncias entre T's, realizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ( $H_{(\text{graus de liberdade})} =$  valor;  $p\text{-value}$ ).

#### 2.9.1.2 Experiências de exposição aguda

De forma a avaliar a existência de diferenças entre o grupo controlo e o grupo exposto às condições agudas, no que diz respeito ao teste comportamental e aos parâmetros de imunidade celular e de resposta humoral, foi realizada uma ANOVA a dois fatores ( $F_{(\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupos})} = F$  valor;  $p\text{-value}$ ). Quando necessário foram realizadas comparações múltiplas utilizando o teste de diferença mínima significativa post-Hoc Tukey (HSD) ( $p\text{-value} < 0,05$ ). Perante o não cumprimento do pressuposto da homogeneidade ( $F_{(\text{graus de liberdade})} =$  valor; nível de significância  $p\text{-value} < 0,05$ ), realizou-se um teste independente  $t$ -student ( $t_{(\text{graus de$

liberdade)= valor; *p-value*), perante o não cumprimento da homogeneidade, o valor do *p-value* é observado através das variâncias iguais não assumidas.

### **2.9.2 Análise de componentes principais**

De forma a avaliar a existência de um gradiente temporal e de padrões de distribuição entre os fatores de stress ambiental (temperatura e amónia), os momentos de amostragem (EEA0, EEA1 e EEA2), os parâmetros de resposta humoral (concentração de lisozima e atividade da protease) e de imunidade celular (percentagem de fagócitos, granulócitos incolores, granulócitos vermelhos e vibráteis), para cada dieta (*Ulva rigida* e ração vegetal), foi realizada uma análise de componentes principais (PCA). Esta análise é utilizada para reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados, enquanto retém o máximo possível das informações originais (variabilidade). Os componentes principais mais importantes (PC1 e PC2) são calculados por combinação linear das variáveis originais e representam adequadamente os dados originais. As posições das variáveis originais no gráfico de componentes principais representam a relevância das suas inter-relações. Assim, se as variáveis estão na posição oposta, estas são fracamente associadas. No entanto, se as variáveis estão muito próximas, sua correlação é forte e positiva. Portanto, a representação gráfica (diagrama) dos objetos investigados é muito útil para detetar uma possível associação, representando simultaneamente os objetos e as variáveis. É assim, possível descobrir as relações mútuas entre os objetos (e.g. dietas e fatores de exposição aguda) e as variáveis (e.g. os parâmetros de resposta celular e de resposta humoral) (Barros *et al.*, 2016). A análise de componentes principais foi realizada com recurso ao software CANOCO 4.5.

## **3 Resultados**

### **3.1 Ensaio nutricional**

O resultado dos testes estatísticos realizados aos indicadores morfométricos dos ouriços-do-mar sujeitos às três EEA encontram-se em anexo (Tabela A1, Anexo I).

### 3.1.1 Indicadores morfométricos

No início do ensaio nutricional (T0) o diâmetro médio dos ouriços-do-mar era de  $40,41 \pm 3,64$  mm, durante o ensaio (T1) este manteve-se constante ( $38,93 \pm 3,67$  mm) e no final do ensaio (T2) o diâmetro médio foi de  $38,49 \pm 3,13$  mm. Comparando o diâmetro médio dos ouriços-do-mar alimentados com a macroalga e com a ração vegetal, observou-se que estes foram semelhantes nas três amostragens realizadas ao longo do ensaio (Figura 4).

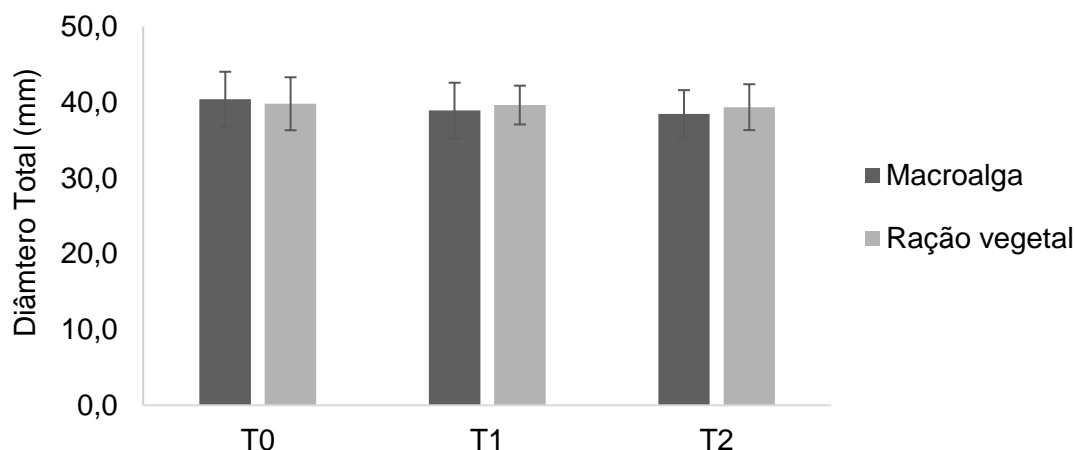


Figura 4 - Diâmetro médio ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal e avaliados nas três amostragens realizada ao longo do ensaio nutricional de 90 dias. T0 - amostragem inicial (N = 72); T1 - amostragem intermédia (N = 72); T2 - amostragem final (N = 72).

No início do ensaio nutricional, o peso médio dos ouriços-do-mar alimentados com a macroalga era ligeiramente mais elevado ( $27,42 \pm 7,07$  g) do que o peso dos ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal ( $26,75 \pm 4,72$  g). Em T1 e em T2 os ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal apresentaram pesos médios mais elevados  $26,01 \pm 4,89$  g e  $25,47 \pm 5,46$  g, respetivamente, do que os ouriços-do-mar alimentados com a macroalga (Figura 5). Observaram-se diferenças estatisticamente significativas no peso médio (ANOVA;  $F_{(2)} = 4,127$ ,  $p$ -value= 0,017) entre T0 e T2 (Tukey HSD;  $p$ -value= 0,013) (Figura 5).

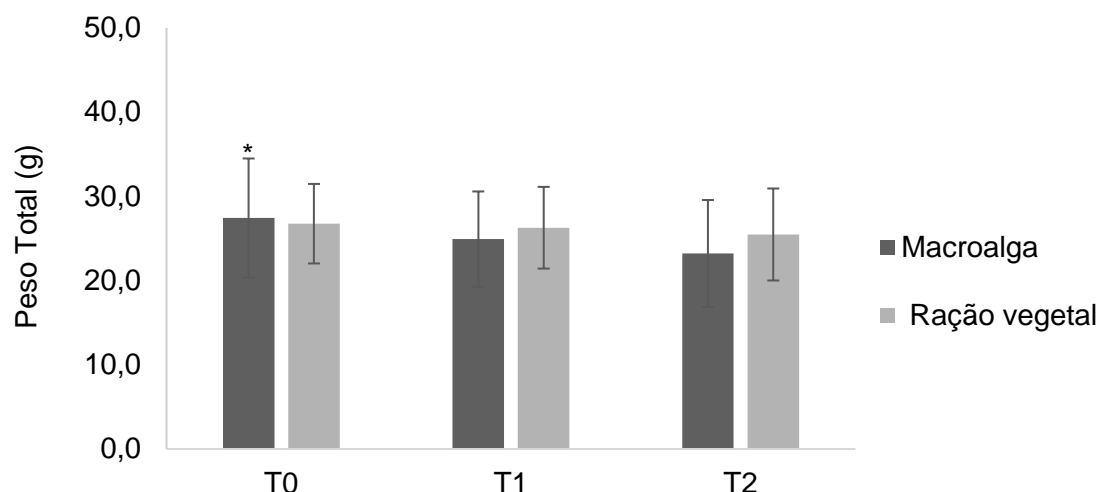


Figura 5- Peso médio ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal avaliados nas três amostragem realizada ao longo do ensaio nutricional de 90 dias. T0 - amostragem inicial (N = 72); T1 - amostragem intermédia (N = 72); T2 – amostragem final (N = 72). Os símbolos \* representa diferenças estatisticamente significativas entre amostragens.

O grupo de ouriços-do-mar alimentados com macroalga, apresentavam no início do ensaio (T0) um IG médio de  $2,30 \pm 1,17\%$ . Em T1 o IG deste grupo aumentou para  $3,53 \pm 2,02\%$ , diminuindo em T2 para  $3,06 \pm 1,27\%$ , no entanto não existem diferenças estatisticamente significativas entre grupos.

No início do ensaio nutricional, o grupo de ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal, apresentaram um IG médio de  $2,88 \pm 1,20\%$ . Em T1, o IG aumentou significativamente para  $10,75 \pm 2,63\%$  e em T2 este valor aumentou ligeiramente para  $12,50 \pm 4,81\%$  (Figura 6). Existem diferenças estatisticamente significativas no IG dos indivíduos alimentados com a ração vegetal (Kruskall-Wallis;  $H_{(2)} = 35,886$ ,  $p\text{-value} < 0,001$ ) entre T0 e T1 (Tukey HSD;  $p\text{-value} < 0,001$ ) e entre T0 e T2 (Tukey HSD;  $p\text{-value} < 0,001$ ) (Figura 6).

Comparando o IG médio dos ouriços-do-mar alimentados com a macroalga e a ração vegetal, observou-se que os ouriços alimentados com a macroalga apresentaram, em média, um IG mais baixo do que os ouriços alimentados com a ração vegetal nas duas amostragens realizadas durante (T1) e no fim do ensaio (T2) (Figura 6).

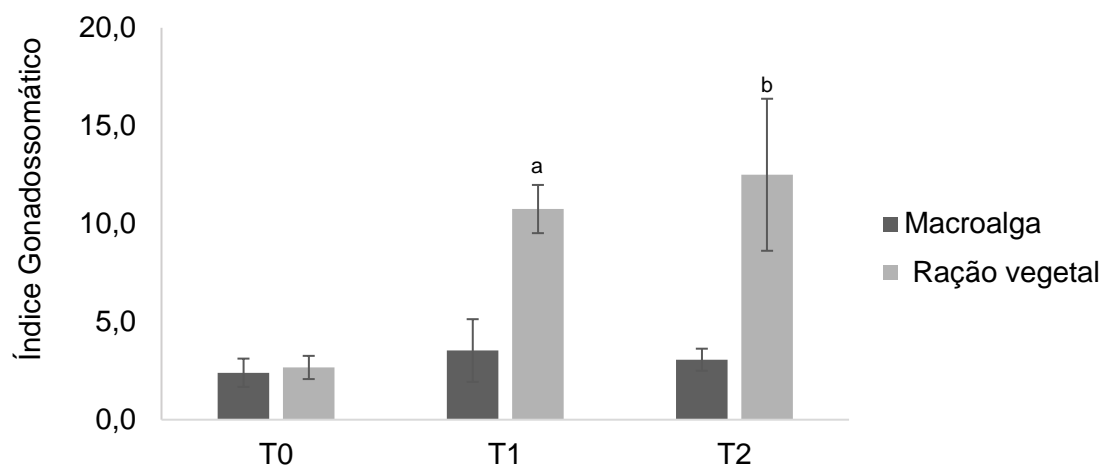


Figura 6- Índice gonadosossomático médio ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal e avaliados nas três amostragens realizadas ao longo do ensaio nutricional, de 90 dias. T0 - amostragem inicial (N = 72); T1 - amostragem intermédia (N = 72); T2 - amostragem final (N = 72). Os símbolos <sup>a</sup> e <sup>b</sup> representam diferenças estatisticamente significativas entre amostragens.

### 3.1.2 Análise histológica

Neste estudo apenas se observaram 4 estados de maturação (I, II, III, VI) sendo que ao longo do ensaio pode observar-se o surgimento de uma maior variedade de estados.

Os 4 estados observados nos machos e fêmeas de *P. lividus*, através da análise histológica estão representados na figura 7 e 8, respetivamente.

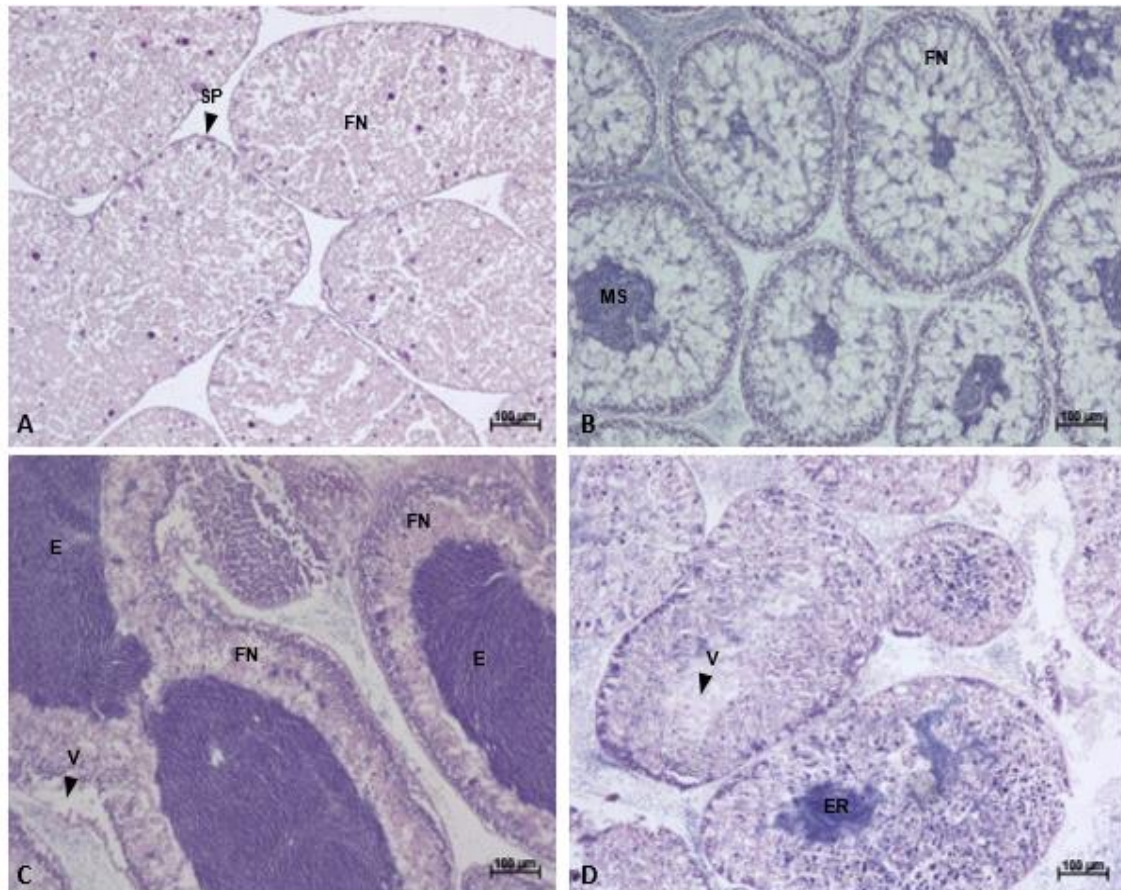


Figura 7- Secções histológicas transversais representativas dos estados de maturação observados nas gónadas masculinas de *Paracentrotus lividus* ao longo do ensaio nutricional de 90 dias. **(A)** Estado I: Recuperação, testículo com uma pequena parede ascinal com espermatócitos e espermatogónios primários (ES) e fagócitos nutritivos (FN); **(B)** Estado II: Crescimento: testículos com colunas de espermatócitos em desenvolvimento a migrar para o centro (ME) e grande quantidade de fagócitos nutritivos (FN); **(C)** Estado III: testículo prematuro com espermatozóides (E), fagócitos nutritivos na periferia e espaços vazios (V); **(D)** Estado VI: Pós-desova, testículo após a desova com espaços vazios e alguns espermatozóides residuais (ER). Barra de escala: 100µm.

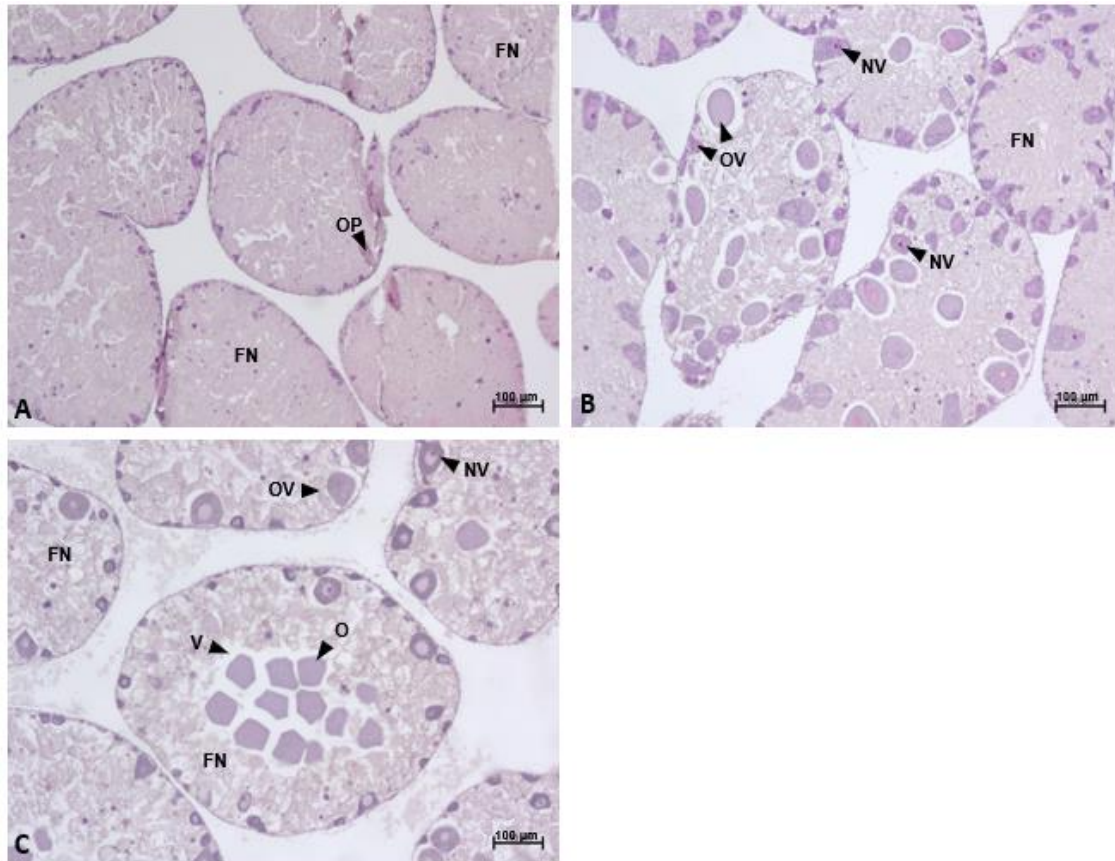


Figura 8- Secções histológicas transversais representativas dos estados de maturação das gónadas femininas de *Paracentrotus lividus* observado ao longo do ensaio nutricional de 90 dias. **(A)** Estado I: Recuperação: reorganização da estrutura interna do ovário, oócitos previtelogénicos (OP) e fagócitos nutritivos (FN); **(B)** Estado II: Crescimento: ovário com oócitos vitelogénicos primários (OV), fagócitos nutritivos (FN) e núcleos visíveis (NV); **(C)** Estado III: Prematuro: oócitos vitelogénicos maiores (OV), fagócitos nutritivos (FN), núcleos visíveis (NV) e óvulos acumulados no lúmen e em espaços vazios (V). Barra de escala: 100µm.

No grupo de ouriços-do-mar alimentados com a macroalga, observou-se uma evolução do estado de maturação das gónadas ao longo do ensaio nutricional. Pode observar-se que em T0, 83,3% (N = 5) dos indivíduos encontravam-se no estado de maturação I (recuperação) e 16,7% (N = 1) encontravam-se no estado de maturação II (crescimento). Em T1, 83,3% (N = 5) dos indivíduos analisados encontravam-se no estado de maturação I (recuperação) e 16,7% (N = 1) já se encontravam no estado de maturação III (prematuro). Em T2, 50,0% (N = 3) dos indivíduos analisados encontravam-se no estado de maturação I (recuperação), 16,7% (N = 1) encontravam-se no estado de maturação II (crescimento), 16,7% (N = 1) encontravam-se no estado de maturação III (prematuro) e 16,7% (N = 1) encontravam-se no estado de maturação VI (pós-desova) (Figura 9).

No grupo de ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal, também foi verificada uma evolução do estado de maturação das gónadas ao longo do ensaio nutricional, observou-se que em T0, 66,7% (N = 4) dos indivíduos analisados encontravam-se no estado de maturação I (recuperação) e 33,3% (N = 2) encontravam-se no estado de maturação II (crescimento). Em T1, 83,3% (N = 5) dos indivíduos analisados encontravam-se no estado de maturação II (crescimento) e 16,7% (N = 1) encontravam-se no estado de maturação III (premature). Em T2, 16,7% (N = 1) dos indivíduos analisados encontravam-se no estado de maturação II (crescimento), 33,3% (N = 2) encontravam-se no estado de maturação III (premature) e 50,0% (N = 3) encontravam-se no estado de maturação VI (pós-desova) (Figura 9).

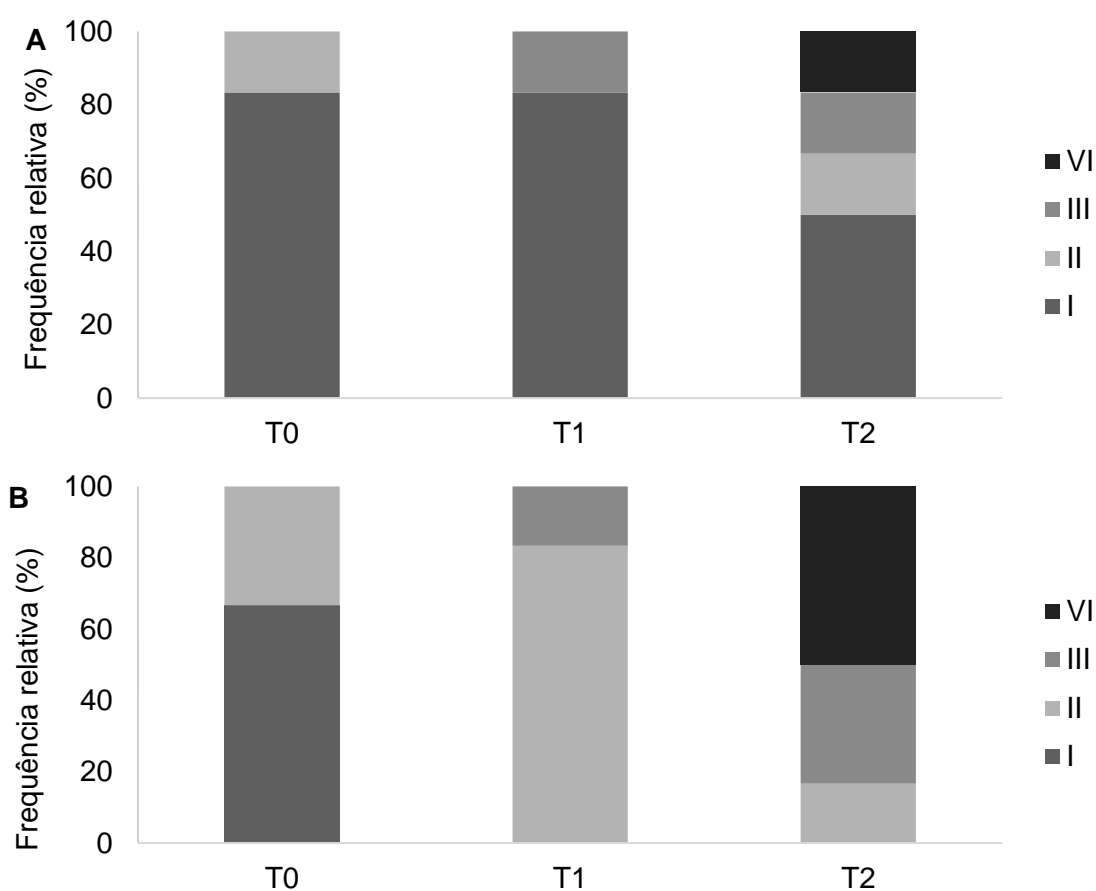


Figura 9- Distribuição dos estados de maturação dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*, nas três amostragens realizadas ao longo do ensaio nutricional (T0: amostragem inicial, N = 12; T1: amostragem intermédia, N = 12; e T2: amostragem final, N = 12). **A** - Grupo alimentado com macroalga (*Ulva rigida*) e **B** – Grupo alimentado com ração vegetal. Os estados de maturação da gónada foram classificados de acordo com Byrne, (1990): estado I- recuperação; estado II- crescimento; estado III- prematuro e estado VI- pós-desova.

### 3.2 Experiências de exposição aguda a fatores de stress ambiental

Nestas experiências de exposição aguda (EEA) foi possível avaliar a resposta a testes comportamentais dos ouriços-do-mar expostos ao aumento brusco de temperatura e concentração elevada de amónia, assim como os diferentes tipos de

células imunes (Figura 10) e a sua percentagem no FC dos ouriços-do-mar *P. lividus*, nas três EEA realizadas no início (EEA0), durante (EEA1) e no final do ensaio nutricional (EEA2).

Na primeira EEA, foram utilizados os mesmos controlos para as duas experiências de exposição a temperatura elevada e a concentração elevada de amónia. Posteriormente, na EEA intermédia e final modificou-se o protocolo de forma a cada conjunto de experiências de exposição aguda ter um controlo próprio.

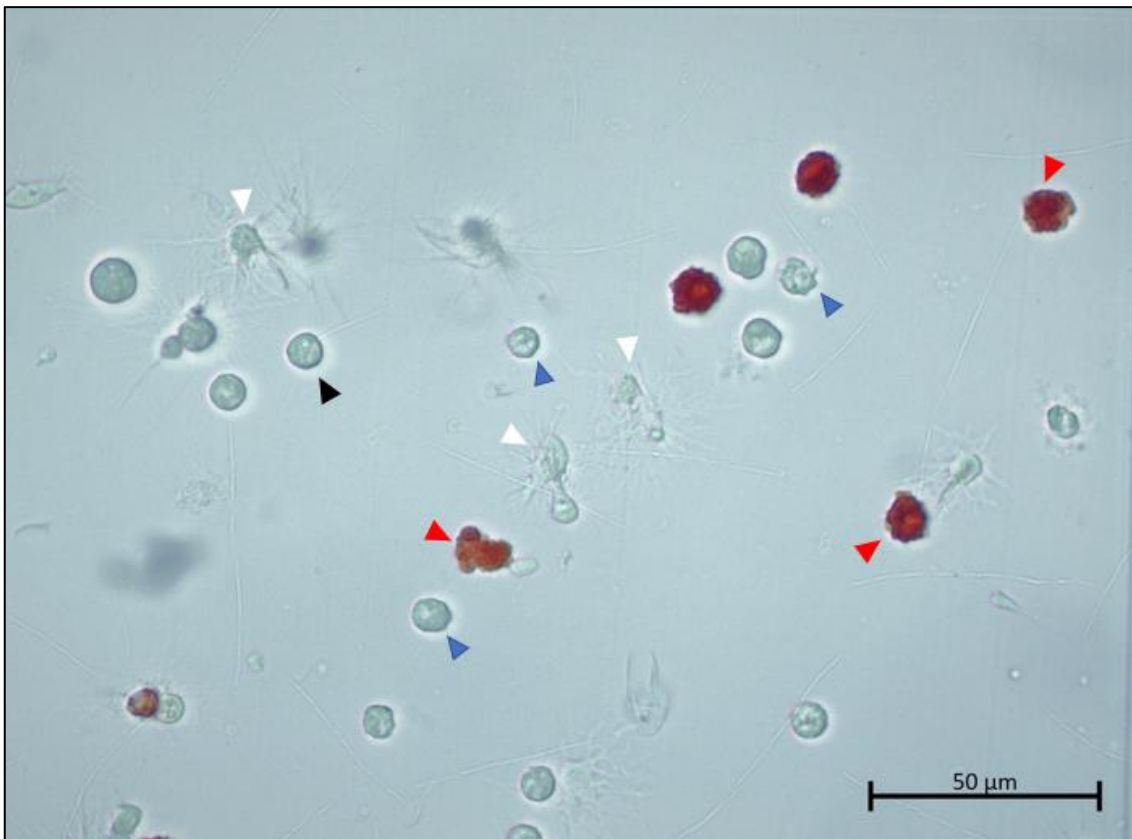


Figura 10- Representação gráfica dos quatro tipos de células imunes do fluido celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*. A seta branca indica os fagócitos; a seta azul indica os granulócitos incolores; a seta vermelha indica os granulócitos vermelhos e a seta preta indica as células vibráteis. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

### 3.2.1 Testes comportamentais

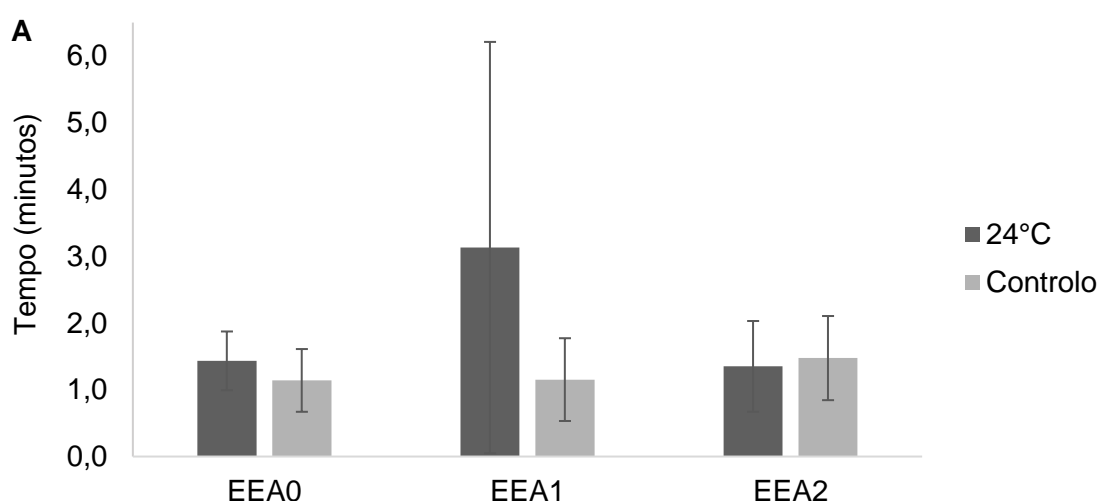
Os testes estatísticos realizados relativos aos testes comportamentais dos ouriços-do-mar sujeitos às três EEA encontram-se em anexo (Tabela A2, Anexo I).

### 3.2.1.1. Exposição aguda à temperatura elevada

Na EEA realizada no início do ensaio nutricional (EEA0), os ouriços-do-mar alimentados com a macroalga e expostos ao aumento brusco da temperatura, apresentaram uma resposta de endireitamento média de  $01:43 \pm 0:44$  min. Na EEA1 esta resposta foi mais longa, de  $03:13 \pm 3:08$  min. Nesta experiência, a grande variabilidade no tempo de resposta não permitiu identificar diferenças estatisticamente significativas. NA EEA2 a resposta de endireitamento foi mais rápida que nas experiências anteriores, de  $01:35 \pm 0:68$  min. (Figura 11A).

Já os ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal, expostos ao aumento brusco de temperatura apresentaram, no início do ensaio (EEA0), uma resposta de endireitamento média de  $01:10 \pm 0:15$  min. Na EEA1, esta resposta foi significativamente mais longa, de  $01:55 \pm 0:40$  min. (mais rápida no grupo controlo, t-student,  $t_{(16)} = 4,539$ ;  $p\text{-value} < 0,001$ ) e na EEA2 esta resposta foi semelhante,  $01:50 \pm 0:72$  min. (o grupo controlo demonstrou uma resposta mais lenta, embora sem diferenças estatisticamente significativas) (Figura 11B).

Comparando as respostas de endireitamento dos indivíduos expostos ao aumento brusco de temperatura, ao longo do tempo, pode observar-se que os indivíduos alimentados com a macroalga apresentaram respostas de endireitamento mais longas na EEA0 e EEA1, contudo na EEA2 esta resposta foi mais rápida, quando comparados com os ouriços alimentados com a ração vegetal (Figura 11).



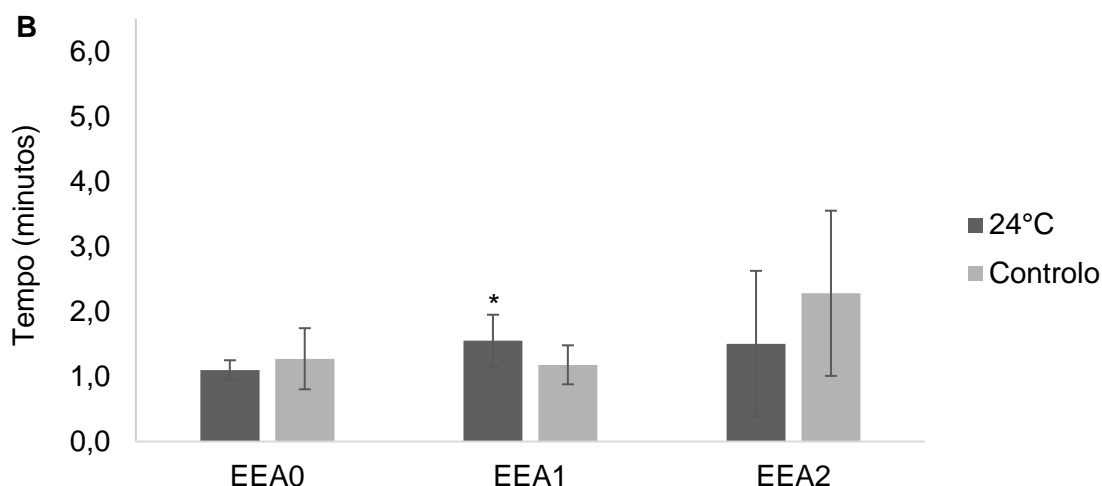


Figura 11- Respostas de endireitamento ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* observadas após as experiências de exposição aguda ao aumento brusco de temperatura, realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional, de 90 dias. **A:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representa diferenças estatisticamente entre grupos experimentais.

### 3.2.1.2. Exposição aguda a amónia elevada

No grupo de ouriços-do-mar alimentados com macroalga, os tempos de resposta de endireitamento foram significativamente afetados pelo nível de exposição à amónia (ANOVA,  $F_{(1)} = 5,109$ ;  $p\text{-value} = 0,028$ ), no entanto, a análise estatística entre o grupo exposto e o grupo controlo dentro de cada experiência não revelou qualquer diferença estatisticamente significativa, devido à grande variabilidade do tempo de resposta. Na EEA realizada no início do ensaio nutricional (EEA0), os ouriços-do-mar, expostos à variação da amónia, apresentaram uma resposta de endireitamento média, de  $01:24 \pm 0:44$  min. Na EEA1 a resposta foi semelhante,  $01:29 \pm 0:45$  min., e na EEA2 a resposta foi mais longa,  $01:54 \pm 0:67$  min. Nesta experiência a grande variabilidade de tempo de resposta observada não permitiu identificar diferenças estatisticamente significativas (Figura 12A).

Tal como no grupo alimentado com a macroalga, as respostas de endireitamento dos ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal, foram significativamente afetadas pelo tempo decorrido no ensaio nutricional (T), pelo nível de exposição à amónia e pela interação entre ambos (ANOVA,  $F_{(2)} = 7,009$ ;  $p\text{-value} = 0,002$ ). No início do ensaio, (EEA0), os ouriços-do-mar, expostos à concentração de amónia elevada, apresentaram uma resposta de endireitamento de  $01:07 \pm 0:25$  min., (significativamente mais rápida no grupo exposto, Tukey HSD;  $p\text{-value} = 0,001$ ). Durante a EEA1 esta resposta foi ligeiramente mais rápida, de  $01:01 \pm 0:26$  min., e na EEA2 final a resposta foi significativamente mais longa,  $01:39 \pm 0:38$  min., (significativamente mais longa no grupo controlo, Tukey HSD;  $p\text{-value} = 0,005$ ) (Figura 12B).

Comparando as respostas de endireitamento dos indivíduos expostos à concentração elevada de amónia, ao longo do tempo, pode observar-se que os indivíduos alimentados com a macroalga apresentaram respostas de endireitamento mais longas que os ouriços alimentados com a ração vegetal em todas as EEA (Figura 12).

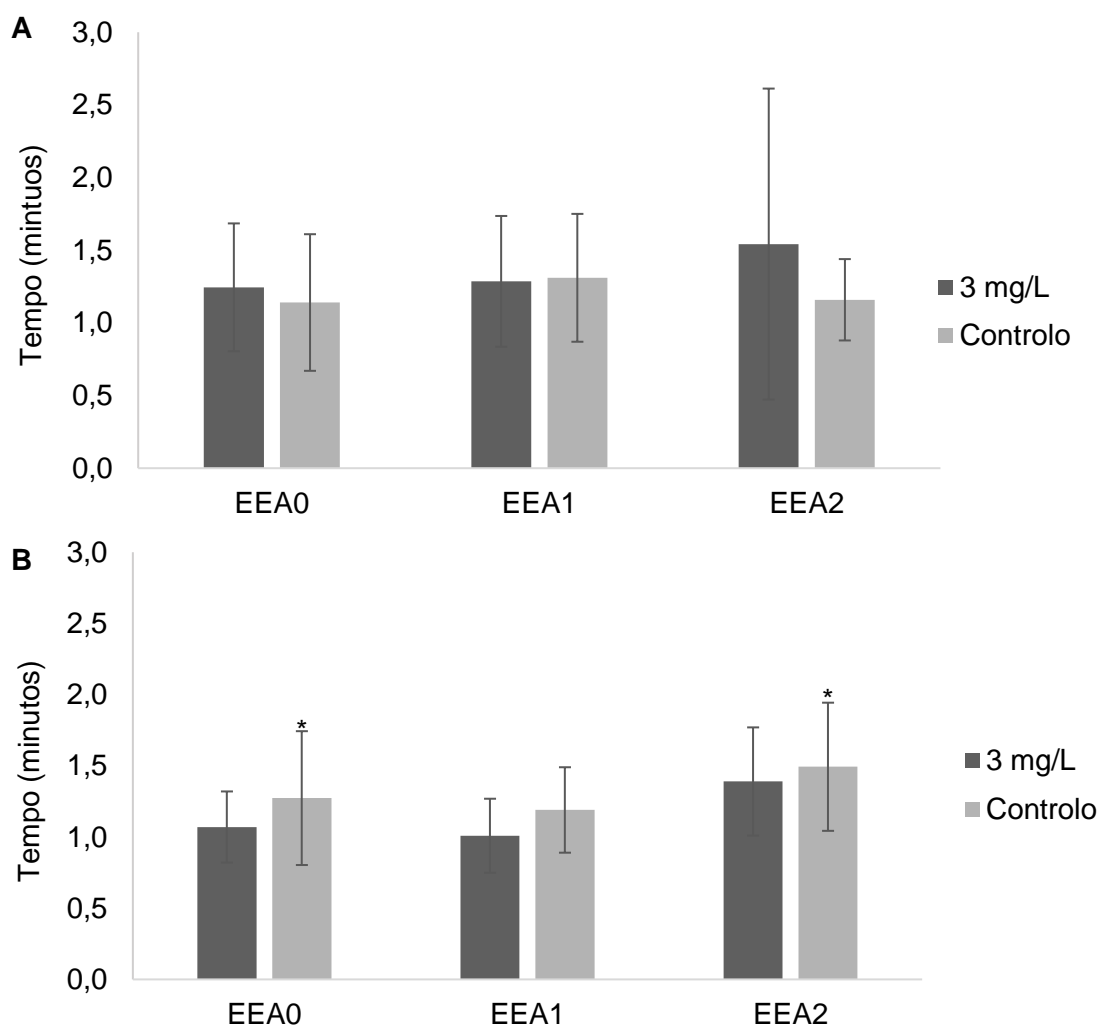


Figura 12- Resposta de endireitamento ( $\pm$  desvio-padrão, DP) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* obtidas após as experiências de exposição aguda à concentração de amónia elevada realizadas no início (EEA0, N = 36) durante (EEA1, N = 36) e no fim (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional, de 90 dias. **A**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representa diferenças estatisticamente significativas entre grupos experimentais.

Relativamente aos resultados dos dois fatores ambientais, os ouriços-do-mar sujeitos ao aumento brusco de temperatura apresentaram respostas de endireitamento mais longas do que aqueles sujeitos à concentração elevada de amónia. Em ambos a macroalga, em geral, promoveu uma resposta de endireitamento mais longa e a ração vegetal promoveu uma resposta de endireitamento mais rápida, quando comparados os indivíduos expostos ao aumento brusco da temperatura e à concentração de amónia elevada com os indivíduos controlo (Figura 11 e 12).

### 3.2.2 Parâmetros de imunidade celular

Os resultados dos testes estatísticos realizados à percentagem de células no FC dos ouriços-do-mar sujeitos às três EEA encontram-se em anexo (Tabela A3, Anexo I).

#### 3.2.2.1. Exposição aguda a temperatura elevada

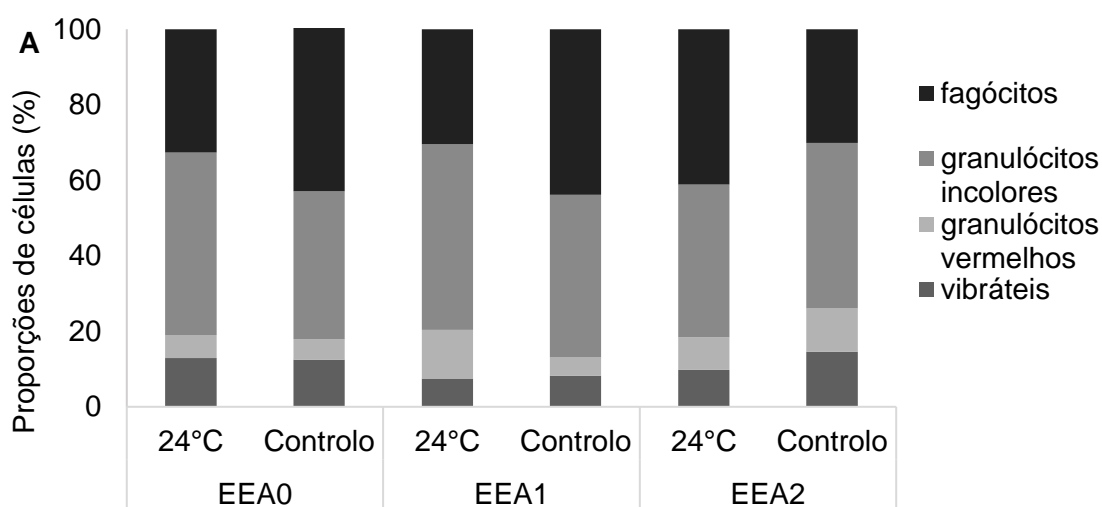
As percentagens de cada tipo de célula imune identificado e quantificado no FC dos ouriços-do-mar sujeitos às três EEA e expostos ao aumento brusco da temperatura, ao longo do ensaio nutricional, são apresentadas na Figura 13.

Na EEA0 o FC dos ouriços-do-mar alimentados com macroalga e expostos à temperatura elevada apresentaram uma percentagem de fagócitos média de 32,68% (mais elevada no grupo controlo, 45,08%). Na EEA1 esta percentagem foi mais baixa, 30,46% (mais elevada no grupo controlo, 43,82%) e na EEA2, a percentagem de fagócitos aumentou para 41,11% (t-student,  $t_{(16)} = 2,315$ ;  $p\text{-value} < 0,034$ , significativamente mais baixa no grupo controlo). No que diz respeito aos granulócitos incolores, a sua percentagem média na EEA0 foi de 48,34% (mais baixa no grupo controlo). Na EEA1, a percentagem de granulócitos foi ligeiramente mais elevada, 49,20% (mais baixa no grupo controlo), e na EEA2 esta diminuiu para 40,44% (mais elevada no grupo controlo, 43,83%). Em relação à percentagem de granulócitos vermelhos, esta foi de 6,05% (mais baixa no grupo controlo) na EEA0. Na EEA1 a percentagem destes granulócitos aumentou para 12,85% (mais baixa no grupo controlo), e na EEA2 a percentagem diminuiu para 8,69% (mais elevada no grupo controlo, 11,43%). No início do ensaio nutricional (EEA0), a percentagem média de células vibráteis foi de 12,94% (semelhante no grupo controlo); na EEA1, esta percentagem foi mais baixa, 7,50% (mais elevada no grupo controlo, 8,23%) subindo para 9,76% (mais elevada no grupo controlo, 14,64%) na EEA2 (Figura 13A).

No que diz respeito ao FC dos ouriços-do-mar alimentados com ração e sujeitos às mesmas condições de aumento de temperatura observaram-se as seguintes variações nas percentagens de células imunes. Na EEA0, a percentagem média de fagócitos foi de 43,22% (mais baixa no grupo controlo). Na EEA1, a percentagem média destas células imunes diminuiu para 27,33% (mais elevada no grupo controlo, 37,20%) e na EEA2 a percentagem média de fagócitos aumentou para 34,84% (mais baixa no grupo controlo). Relativamente aos granulócitos incolores, na EEA0, a percentagem média destas células foi de 43,74%. Na EEA1 esta percentagem aumentou para 51,44% (mais baixa no grupo controlo) e na EEA2 diminuiu para 47,54% (mais elevada no grupo controlo, 50,24%). Em relação aos granulócitos vermelhos, observou-se que a percentagem destas células no FC é afetada pelo tempo decorrido do ensaio nutricional

(T) (ANOVA,  $F_{(2)} = 4,552$ ;  $p\text{-value} = 0,015$ ). Na EEA0, os ouriços-do-mar apresentaram uma percentagem de granulócitos vermelhos média de 7,06% (semelhante no grupo controlo); na EEA1 a percentagem de granulócitos aumentou em relação à EEA anterior, para 13,73% (Tukey HSD;  $p\text{-value} = 0,018$ , significativamente mais baixa no grupo controlo) e na EEA2 esta diminuiu para 8,19% (mais baixa no grupo controlo). Após EEA0, os ouriços-do-mar apresentaram uma percentagem média de células vibráteis de 5,98% (mais elevada no grupo controlo, 7,51%); na EEA1 intermédia a percentagem destas células aumentou para 7,51% (ligeiramente mais baixa no grupo controlo) e na EEA2 final voltou a aumentar para 9,44% (mais elevada no grupo controlo, 13,29%) (Figura 13B).

Relativamente aos resultados das duas dietas pode observar-se que, ao longo do tempo, os indivíduos alimentados com a macroalga promoveram, em geral, um aumento na percentagem de granulócitos incolores e vermelhos e uma diminuição na percentagem de fagócitos e vibráteis. Por outro lado, os indivíduos alimentados com a ração vegetal promoveram, em geral, um aumento na percentagem de fagócitos e granulócitos vermelhos e uma diminuição na percentagem de granulócitos incolores e vibráteis, quando comparados com os indivíduos controlo (Figura 13).



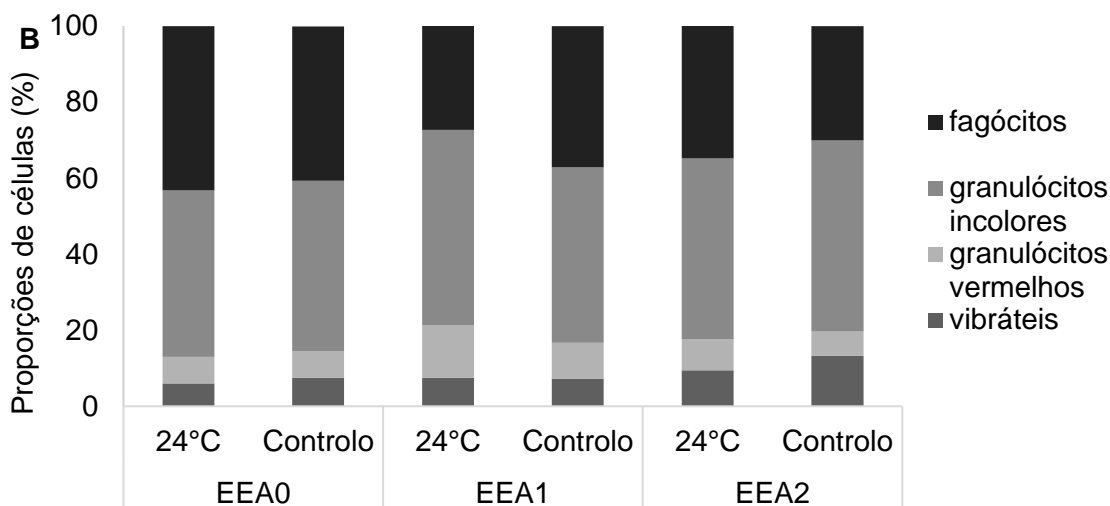


Figura 13- Percentagem das diferentes células imunes presentes no fluído celômico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus*, após as experiências de exposição aguda a temperatura elevada realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36), e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal.

### 3.2.2.2 Exposição aguda a amónia elevada

A percentagem de cada tipo de célula imune observada no FC dos ouriços-do-mar sujeitos às três EEA à concentração de amónia elevada realizadas ao longo do ensaio nutricional são apresentadas na Figura 14.

A percentagem de fagócitos presentes no FC de ouriços-do-mar alimentados com macroalga após a EEA1 foi significativamente afetada pela interação entre o tempo decorrido do ensaio nutricional (T) e o nível de exposição à amónia (ANOVA,  $F_{(2)} = 6,743$ ;  $p\text{-value} = 0,003$ ). Na EEA0, os ouriços-do-mar apresentaram uma percentagem média de fagócitos de 32,66% (mais elevada no grupo controlo, 45,08%); na EEA1, esta percentagem foi mais elevada, 54,53% (Tukey HSD;  $p\text{-value} = 0,002$ , significativamente mais baixa no grupo controlo), diminuindo para 44,81% na EEA2 (mais elevada no grupo controlo, 47,99%). A percentagem de granulócitos incolores foi também significativamente afetada pela interação entre o tempo decorrido do ensaio nutricional (T) e o nível de exposição à amónia (ANOVA,  $F_{(2)} = 10,293$ ;  $p\text{-value} < 0,001$ ). Após a EEA0, os ouriços-do-mar apresentaram uma percentagem de granulócitos incolores média de 51,62% (Tukey HSD;  $p\text{-value} = 0,030$ , significativamente mais baixa no grupo controlo). Na EEA1 a percentagem destas células foi mais baixa, 25,72% (Tukey HSD;  $p\text{-value} = 0,001$ , significativamente mais elevada no grupo controlo 45,39%), subindo para 34,39% (mais baixa no grupo controlo) na EEA2. No início do ensaio (EEA0), os ouriços-do-mar apresentaram uma percentagem média de granulócitos vermelhos média de 7,30% (mais baixa no grupo controlo). Na EEA1 a percentagem foi semelhante, 7,17% (mais elevada no grupo controlo, 11,43%) e na EEA2 a percentagem

foi, também, semelhante 8,60% (semelhante no grupo controlo). No que diz respeito às células vibráteis quantificadas no FC dos ouriços do mar, estas apresentaram uma percentagem média de 8,42% (mais elevada no grupo controlo, 12,53%) na EEA0. Após a EEA1, a percentagem média destas células aumentou para 12,58% (ligeiramente mais baixa no grupo controlo), e na EEA2 esta manteve-se relativamente constante, 12,21% (mais elevada no grupo controlo, 19,13%) (Figura 14A).

A percentagem de fagócitos média presente no FC dos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal, expostos à amónia elevada, no início do ensaio nutricional (EEA0) foi de 38,98% (mais elevada no grupo controlo, 40,57%); na EEA1 e EEA2 a percentagem média foi semelhante, 36,59% e 37,83%, respetivamente (ambas mais baixas no grupo controlo). No que diz respeito aos granulócitos incolores, na EEA0, a percentagem média destas células imunes foi de 47,82% (mais baixa no grupo controlo). Na EEA1, a percentagem da granulócitos incolores aumentou ligeiramente para 50,34% (mais baixa no grupo controlo) e na EEA2 a percentagem diminuiu para 38,21% (mais elevada no grupo controlo, 43,42%). Em relação aos granulócitos vermelhos, observou-se que na EEA0, os ouriços-do-mar apresentaram uma percentagem média de 4,27% (mais elevada no grupo controlo, 7,04%). Na EEA1, esta percentagem aumentou ligeiramente para 5,81% (mais elevada no grupo controlo, 9,05%) e na EEA2, a percentagem média de granulócitos aumentou para 10,20% (mais baixa no grupo controlo). No que diz respeito à quantidade de células vibráteis, observou-se que a sua percentagem era diferente entre os níveis de exposição nas três EEA (ANOVA,  $F_{(2)} = 5,387$ ;  $p\text{-value} = 0,008$ ). Na EEA0, os ouriços-do-mar apresentaram uma percentagem média de células vibráteis de 8,93% (mais baixa no grupo controlo). Na EEA1 a percentagem diminuiu para 7,26% (mais elevada no grupo controlo, 8,27%) e na EEA2 a percentagem aumentou para 13,76% (mais elevada no grupo controlo, 15,37%). Sendo que a percentagem de células vibráteis na EEA2 é significativamente mais elevada do que a percentagem observada na EEA0 (Tukey HSD;  $p\text{-value} = 0,030$ ) e na EEA1 (Tukey HSD;  $p\text{-value} = 0,011$ ) (Figura 14B).

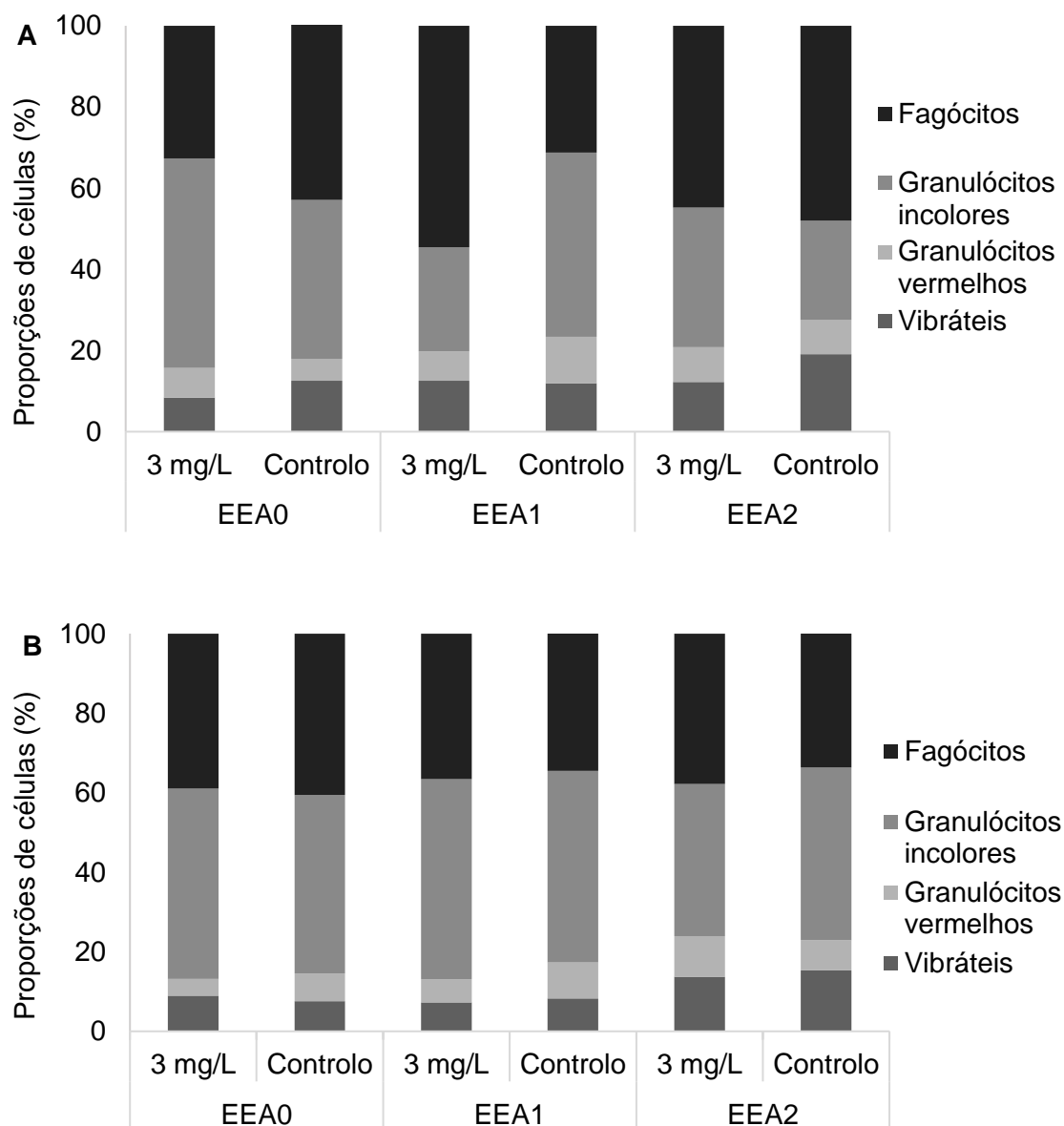


Figura 14- Percentagem das diferentes células imunes presentes no fluido celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* após as experiências de exposição aguda a concentração elevada de amónia, obtidos no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B:** resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal.

Relativamente aos resultados do impacto da exposição dos ouriços-do-mar à concentração elevada de amónia, os grupos alimentados com macroalga e com ração demonstram uma tendência diferente entre si. A macroalga, em geral, promoveu um aumento na percentagem de granulócitos incolores e vermelhos e uma diminuição na percentagem de fagócitos e células vibráteis. A ração vegetal promoveu, em geral, um aumento na percentagem de fagócitos e granulócitos incolores e uma diminuição na percentagem de granulócitos vermelhos e vibráteis, quando comparados com os indivíduos controlo (Figura 14).

Em todas as EEA realizadas, o FC do grupo de ouriços-do-mar alimentados com macroalga e sujeitos aos dois fatores de exposição aguda apresentaram percentagens mais elevadas de granulócitos incolores e vermelhos e percentagens mais baixas de fagócitos e células vibráteis. Já no grupo de ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal sujeitos à exposição aguda de aumento da temperatura, observaram-se percentagens mais elevadas de fagócitos e granulócitos vermelhos, e percentagens menores de granulócitos incolores e células vibráteis. Quando expostos a concentrações elevadas de amónia, este grupo de ouriços apresentou maiores percentagens de fagócitos e granulócitos incolores e percentagens menores de granulócitos vermelhos e células vibráteis, quando comparados com os indivíduos de controlo (Figuras 13 e 14).

### **3.2.3 Parâmetros de resposta humoral**

Os resultados dos testes estatísticos realizados à concentração da lisozima e à atividade da protease no FC dos ouriços-do-mar sujeitos às três EEA encontram-se em anexo (Tabela A4, Anexo I).

#### **3.2.3.1. Concentração de Lisozima**

##### **3.2.3.1.1. Exposição aguda a temperatura elevada**

Após a EEA0, o FC dos ouriços-do-mar alimentados com a macroalga apresentaram uma concentração de lisozima média de  $1,21 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$  (t-student,  $t_{(16)} = 4,502$ ;  $p\text{-value} < 0,001$ , significativamente mais elevada no grupo controlo). Na EEA1 esta foi mais elevada, de  $1,62 \pm 0,44 \mu\text{g/mL}$  (ligeiramente mais elevada no grupo controlo) e na EEA2 a concentração foi mais elevada de  $2,15 \pm 0,73 \mu\text{g/mL}$  (t-student,  $t_{(16)} = 3,455$ ;  $p\text{-value} = 0,003$ , significativamente mais baixa no grupo controlo) (Figura 15A).

No início do ensaio (EEA0), o FC dos ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal apresentaram uma concentração de lisozima média de  $0,53 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$  (t-student,  $t_{(16)} = 6,386$ ;  $p\text{-value} < 0,001$ , significativamente mais elevada no grupo controlo). Na EEA1 a concentração desta enzima foi mais elevada,  $1,99 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$  (t-student,  $t_{(16)} = 4,256$ ;  $p\text{-value} = 0,001$ , significativamente mais baixa no grupo controlo) e na EEA2, a concentração aumentou ligeiramente para  $2,18 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$  (mais baixa no grupo controlo) (Figura 15B).

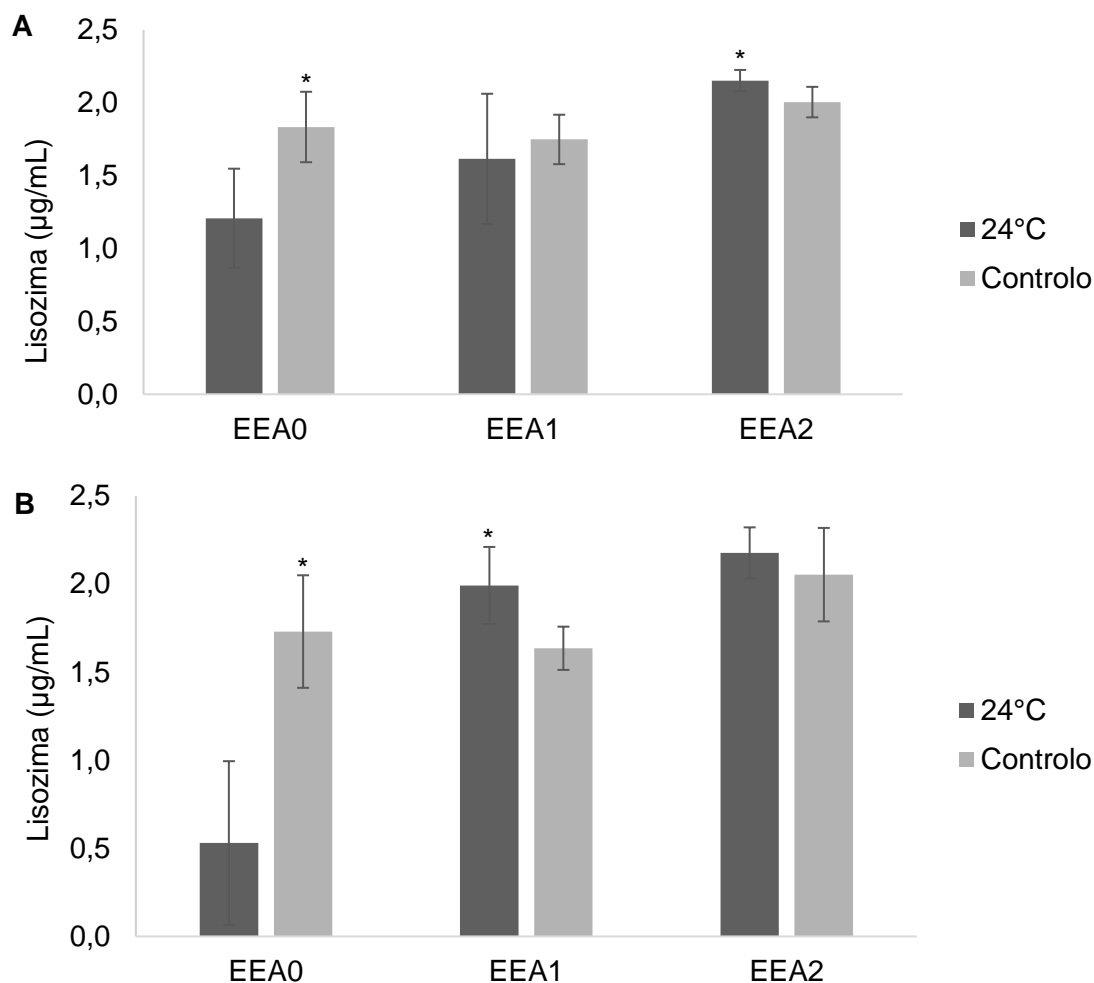


Figura 15- Concentração de lisozima ( $\mu\text{g/mL}$ ) no fluido celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* sujeitos às experiências de exposição aguda ao aumento brusco da temperatura realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A**: resultados obtidos com ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados obtidos com aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representam as diferenças estatisticamente significativas entre grupo exposto e grupo controlo.

À exceção da EEA inicial do ensaio nutricional, em que o FC dos ouriços-do-mar do grupo alimentado com macroalga apresentaram uma concentração de lisozima mais elevada, nas restantes EEA o grupo de ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal apresentam concentrações de lisozima ligeiramente mais elevadas (Figura 15).

### 3.2.3.1.2. Exposição aguda a amónia elevada

Observando os resultados da EEA0, o FC dos ouriços-do-mar alimentados com a macroalga apresentaram uma concentração média de lisozima de  $1,18 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$ , ( $t$ -student,  $t_{(16)} = 3,925$ ;  $p$ -value = 0,001, significativamente mais elevada no grupo controlo). Na EEA1 a concentração de lisozima foi mais elevada do que na experiência anterior,  $1,84 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$  (ligeiramente mais elevada no grupo controlo) e na EEA2, a

concentração desta enzima aumentou ligeiramente para  $2,09 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$  (semelhante no grupo controlo) (Figura 16A).

Após a EEA0, o FC dos ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal apresentaram uma concentração de lisozima média de  $1,76 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$  (semelhante no grupo controlo). Na EEA1 a concentração desta enzima aumentou ligeiramente para  $2,02 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$  (semelhante no grupo controlo) e na EEA2 manteve-se relativamente constante,  $1,99 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$  (semelhante no grupo controlo) (Figura 16B).

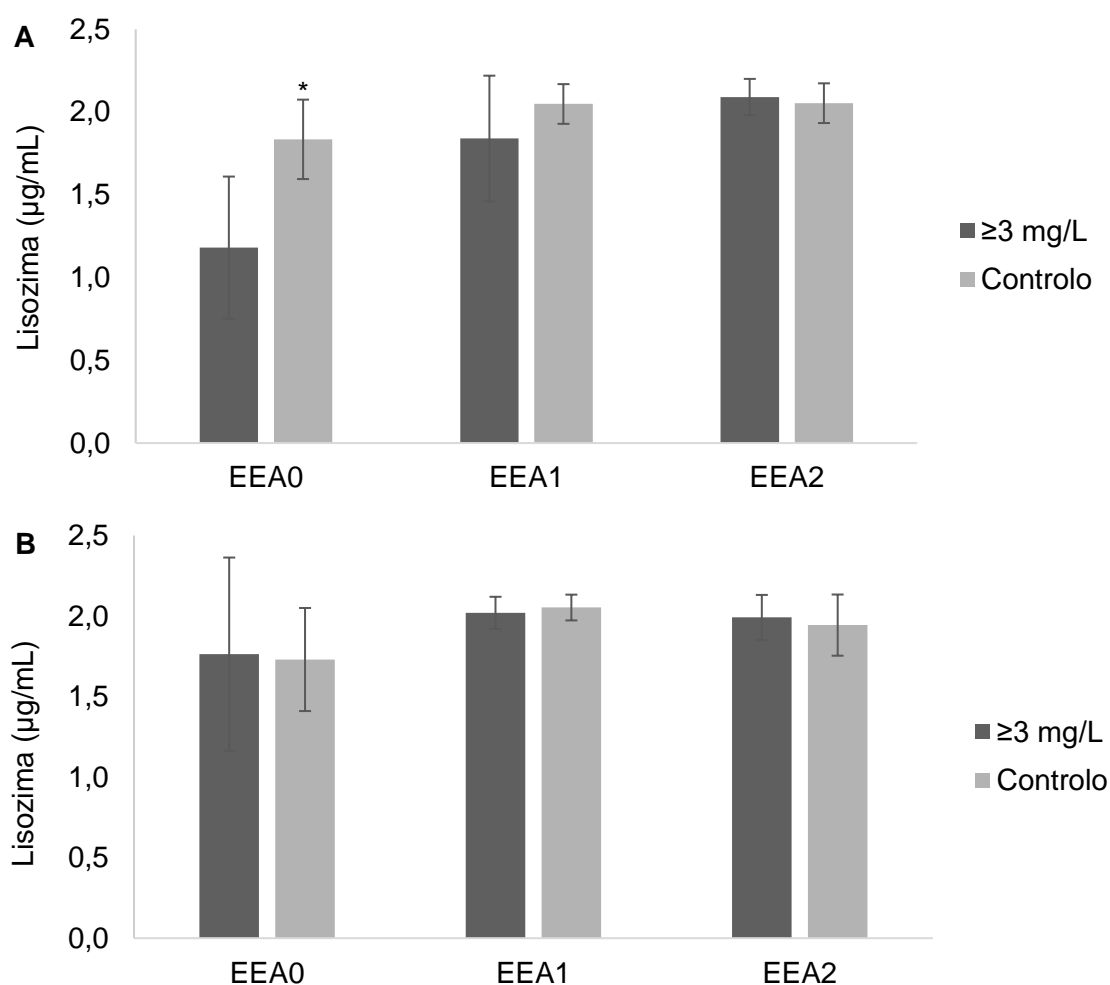


Figura 16- Concentração de lisozima ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) determinada no fluído celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* após as experiências de exposição aguda a concentração elevada de amónia, realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representa as diferenças estatisticamente significativas entre grupos expostos e grupo controlo.

Comparando a concentração de lisozima no FC dos indivíduos expostos à concentração de amónia elevada, ao longo do tempo, pode observar-se que os indivíduos alimentados com a macroalga apresentaram concentrações de lisozima

semelhantes, com exceção da EEA0, onde os ouriços-do-mar alimentados com ração apresentaram concentrações mais elevadas de lisozima (Figura 16).

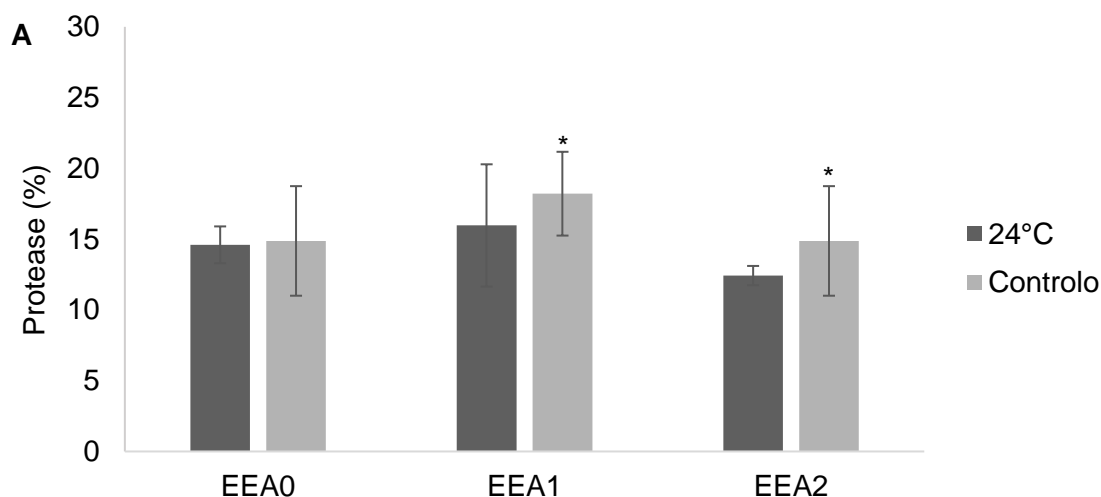
Comparando os resultados obtidos, a concentração de lisozima no FC dos ouriços-do-mar, foi semelhante em ambos fatores ambientais. Em geral, os indivíduos alimentados com a dieta à base de macroalga, promoveram uma diminuição da concentração de lisozima e os indivíduos alimentados com a dieta à base da ração vegetal, apresentaram uma semelhança na concentração, quando comparados os indivíduos expostos com os respectivos grupos de controlo (Figura 15 e 16).

### 3.2.3.2 Atividade da Protease

#### 3.2.3.2.1 Exposição aguda a temperatura elevada

A atividade das protease determinada ao longo das EEA realizadas foi significativamente afetada pelo tempo decorrido do ensaio (T) (ANOVA,  $F_{(2)}= 5,609$ ,  $p\text{-value}= 0,006$ ), entre as EEA1 e EEA2 (Tukey HSD;  $p\text{-value}= 0,005$ ). No início do ensaio nutricional (EEA0), o FC dos ouriços-do-mar alimentados com a macroalga apresentaram uma atividade da protease média de 14,60% (semelhante no grupo controlo). Após a EEA1, a atividade da protease aumentou para 15,97% (significativamente mais elevada no grupo controlo) e na EEA2, a atividade desta enzima diminuiu para 12,43% (significativamente mais elevada no grupo controlo) (Figura 17A).

Na EEA0 inicial, o FC dos ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal apresentaram uma atividade da protease média de 18,03% (semelhante no grupo controlo). Na EEA1 a atividade diminuiu ligeiramente para 17,41% (semelhante no grupo controlo) e na EEA2, esta voltou a diminuir para 13,83% (mais elevada no grupo controlo) (Figura 17B).



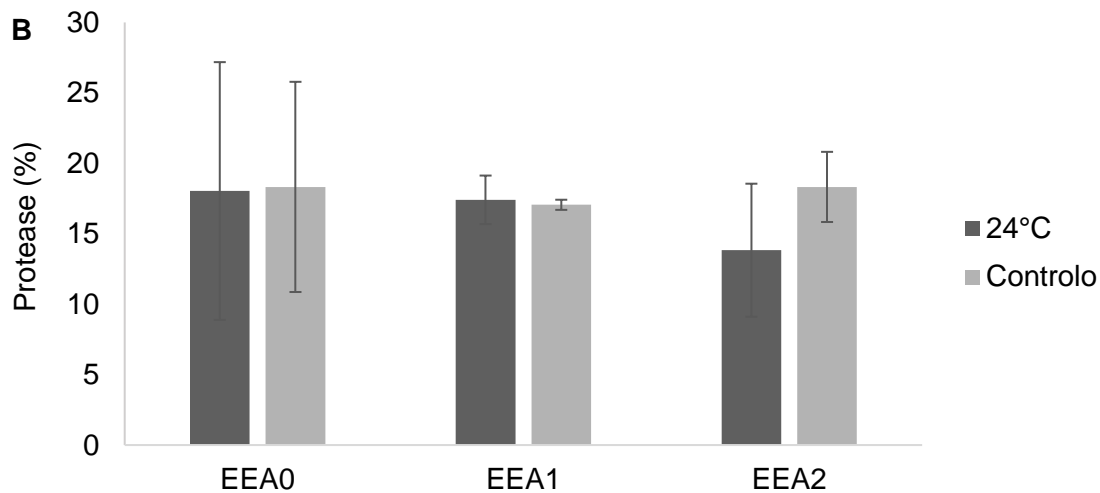


Figura 17- Atividade da protease (%) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) presente no fluido celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* após as experiências de exposição aguda a temperatura elevada, realizadas no início (T0, N = 36), durante (T1, N = 36) e no final (T2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. O símbolo \* representa as diferenças estatisticamente significativas entre amostragens.

Quando expostos ao aumento brusco da temperatura, o FC dos ouriços-do-mar alimentados com a macroalga apresentaram, em todas as EEA, concentrações de protease mais baixas do que o FC dos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal (Figura 17).

### 3.2.3.2.2 Exposição aguda a amónia elevada

Após a EEA0, o FC dos ouriços-do-mar alimentados com a macroalga e expostos a amónia elevada, apresentaram a atividade da protease média de 15,16% (semelhante no controlo). Na EEA1 a atividade da protease aumentou para 17,85% (ligeiramente mais baixa no controlo) e na EEA2, a atividade da protease diminuiu para 14,53% (semelhante no controlo) (Figura 18A).

No que diz respeito à atividade da protease no FC do grupo de ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal, observou-se uma atividade média de protease de 15,35% (mais elevada no controlo) na EEA0. Na EEA1 a atividade da protease destes ouriços-do-mar aumentou para 17,69% (mais elevada no controlo) e na EEA2 a atividade da protease diminuiu para 14,32%, (ligeiramente mais baixa no controlo) (Figura 18B).

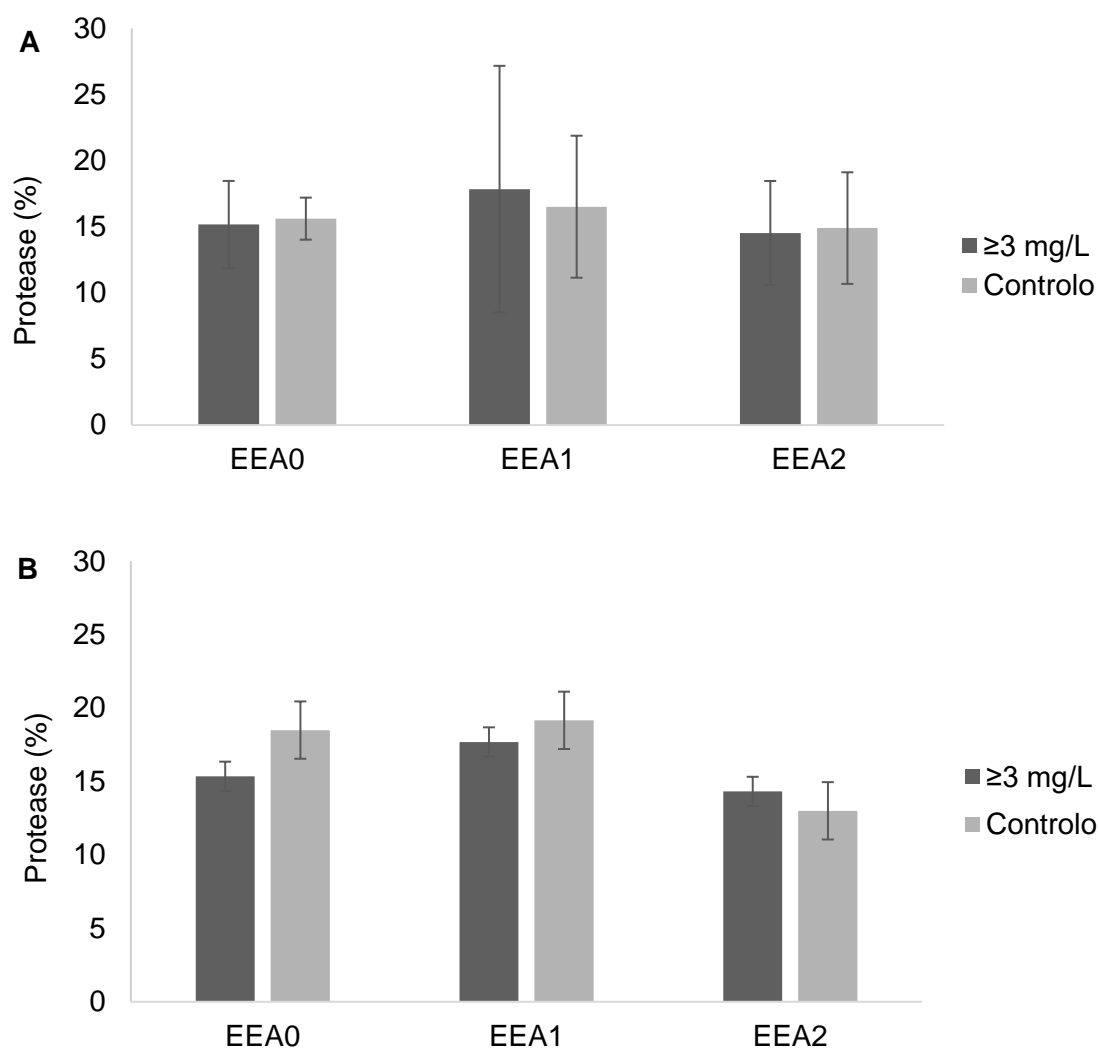


Figura 18- Atividade da protease (%) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) presente no fluido celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* nas experiências de exposição aguda a concentração elevada de amónia realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias. **A**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e **B**: resultados referentes aos ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal.

Comparando a percentagem de protease no FC dos indivíduos expostos à concentração de amónia elevada, pode observar-se que este parâmetro foi semelhante ao longo de todo o ensaio entre indivíduos expostos e indivíduos de controlo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na atividade da protease entre os indivíduos expostos e os respetivos grupos de controlo (Figura 18).

Comparando os resultados obtidos nos dois fatores ambientais, pode observar-se que estes promoveram atividades da protease semelhantes entre si, assim como as duas dietas (Figura 17 e 18).

### 3.2.3.3 Produção de Óxido Nítrico

Na EEA0, não se detetou a produção de ON no FC dos grupos de ouriços-do-mar alimentados com a macroalga e com a ração vegetal para ambos os fatores de stress ambiental. Durante a EEA1 apenas os indivíduos alimentados com a ração vegetal apresentaram produção de óxido nítrico. Neste grupo, os ouriços-do-mar expostos ao aumento brusco da temperatura, apresentaram uma concentração média de ON de  $2,59 \pm 2,24 \mu\text{M/mL}$  e os ouriços-do-mar expostos à concentração de amónia elevada registaram uma concentração de ON de  $0,77 \pm 1,33 \mu\text{M/mL}$ . Na EEA2, a produção de ON também só ocorreu nos indivíduos alimentados com a ração vegetal. Os ouriços-do-mar deste grupo expostos ao aumento brusco da temperatura apresentaram uma concentração média de ON de  $1,88 \pm 3,26 \mu\text{M/mL}$  e aqueles expostos à concentração de amónia elevada apresentaram uma concentração de  $0,15 \pm 0,28 \mu\text{M/mL}$  (Tabelas V e VI).

Tabela V- Concentração de óxido nítrico ( $\mu\text{M/mL}$ ) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) no fluido celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal e sujeitos a experiências de exposição aguda a temperatura elevada, realizadas no início (T0, N = 36), durante (T1, N = 36) e no final (T2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias.

Óxido nítrico ( $\mu\text{M/mL}$ )	T0	T1	T2
<b>Macroalga</b>	-	-	-
<b>Ração vegetal</b>	-	$2,59 \pm 2,24$	$1,88 \pm 3,26$
<b>Controlo alga</b>	-	-	-
<b>Controlo ração</b>	-	$1,37 \pm 1,72$	$1,53 \pm 0,19$

Tabela VI- Concentração de óxido nítrico ( $\mu\text{M/mL}$ ) ( $\pm$  desvio-padrão, DP) no fluido celómico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal e sujeitos a experiências de exposição aguda a concentração elevada de amónia realizadas no início (EEA0, N = 36), durante (EEA1, N = 36) e no final (EEA2, N = 36) do ensaio nutricional de 90 dias.

Óxido nítrico ( $\mu\text{M/mL}$ )	T0	T1	T2
<b>Macroalga</b>	-	-	-
<b>Ração vegetal</b>	-	$0,77 \pm 1,33$	$0,15 \pm 0,28$
<b>Controlo alga</b>	-	-	-
<b>Controlo ração</b>	-	$0,14 \pm 0,24$	$0,66 \pm 1,16$

Apenas se observou a produção de ON no FC do grupo de ouriços-do-mar alimentados com ração vegetal. Neste grupo, tanto o grupo exposto à temperatura elevada e à amónia elevada produziram ON, porém os indivíduos expostos ao aumento brusco da temperatura demonstraram uma produção mais elevada do que os indivíduos expostos à concentração elevada de amónia. Os indivíduos expostos à temperatura elevada apresentaram uma concentração de óxido nítrico mais elevadas e no fator

amónia apresentaram concentrações maiores na EEA1 e menores na EEA2 quando comparados com os indivíduos do controlo.

### **3.3 Correlação entre imunidade celular e humoral**

#### **3.3.1 Macroalga (*Ulva rigida*)**

A análise de componentes principais (PCA) demonstrou os dois componentes principais (PC1 e PC2), que juntos explicam 69,9% da variabilidade geral dos dados. O gráfico da PCA ilustra que, em geral, as amostras demonstram um pequeno gradiente temporal, com exceção de alguns valores nomeadamente os resultados obtidos na EEA intermédia que estão dispersos dos restantes (Figura 19).

Pode distinguir-se três grupos neste gráfico, o primeiro grupo (T0CT, T0CA mais os pontos dispersos T1CT e T13A) é caracterizado por uma correlação positiva entre a atividade da protease e a percentagem de fagócitos. Por outro lado, observou-se uma correlação oposta entre a percentagem de fagócitos e granulócitos incolores e a concentração de granulócitos vermelhos e entre a atividade da protease e a percentagem de granulócitos vermelhos. O segundo grupo (T03A, T024 mais o ponto disperso T124) é caracterizado por uma correlação positiva entre os granulócitos incolores e os granulócitos vermelhos. Em contraste é caracterizado por uma correlação oposta entre a percentagem de granulócitos incolores e a concentração de lisozima e as percentagens de células vibráteis e fagócitos.

O terceiro grupo (T1CA, T224, T2CT e os pontos dispersos T23A e T2CA) é caracterizado por uma correlação positiva entre a percentagem de granulócitos vermelhos a concentração de lisozima e a percentagem de granulócitos incolores, os pontos dispersos são caracterizados por uma forte correlação entre a concentração de lisozima e a percentagem de células vibráteis. Em contraste, este grupo é caracterizado por uma correlação oposta entre a percentagem granulócitos vermelhos e a atividade da protease e percentagem de fagócitos, os pontos dispersos são caracterizados por uma correlação oposta entre a concentração de lisozima e a percentagem de granulócitos incolores assim como entre a percentagem de células vibráteis e a percentagem de granulócitos incolores (Figura 19).

Em geral pode observar-se que a concentração de lisozima e a percentagem de células vibráteis foram os parâmetros que apresentaram uma correlação positiva mais forte, seguido pela correlação positiva entre a percentagem de fagócitos a atividade da protease, pode observar-se uma correlação oposta entre os granulócitos incolores e a

concentração de lisozima e por último uma correlação oposta entre a protease e os granulócitos vermelhos (Figura 19).

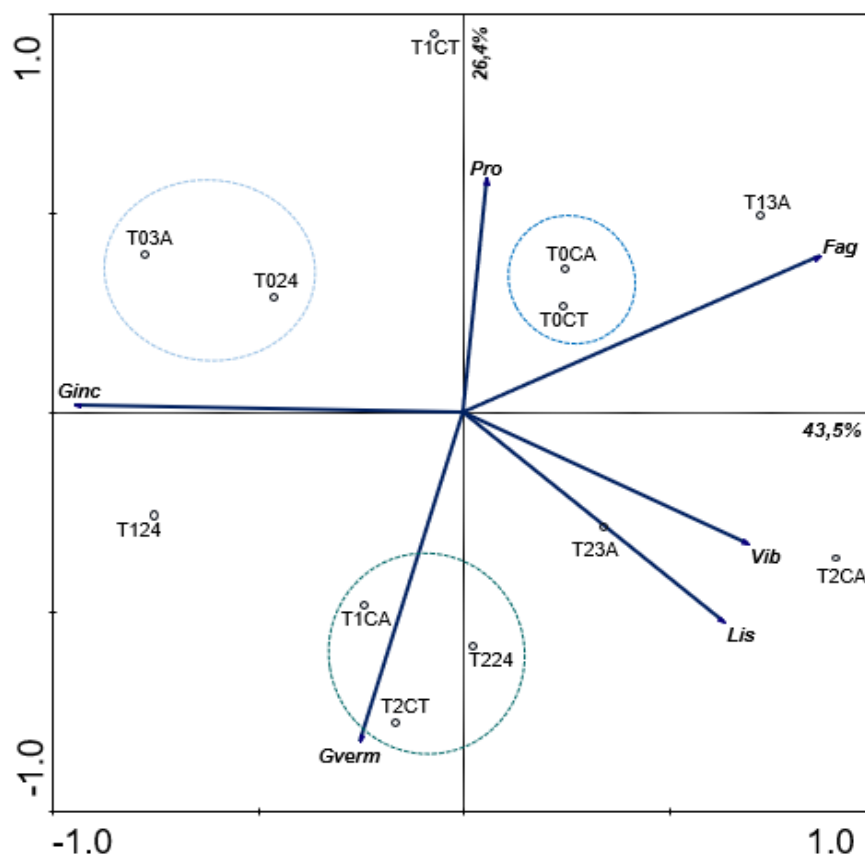


Figura 19- Gráfico bidimensional de componentes principais da correlação entre parâmetros de imunidade celular e parâmetros de imunidade humoral utilizados para caracterizar a resposta imune dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a macroalga (*Ulva rigida*). Cada vetor representa um dos parâmetros analisados (percentagem de fagócitos-fag, percentagem de granulócitos incolores-Ginc, percentagem de granulócitos vermelhos-Gverm, percentagem de células vibráteis-vib, concentração de lisozima-lis e atividade da protease-pro) e cada ponto representa os grupos amostrais sujeitos a exposição aguda de temperatura (T) e controlo (CT) e concentração elevada de amónia (A) e controlo (CA) no início (T0), durante (T1) e final (T2) do ensaio nutricional de 90 dias.

### 3.3.2 Ração vegetal

A análise de componentes principais (PCA) demonstrou dois componentes principais (PC1 e PC2) que juntos explicam 68,0% da variabilidade observada nos parâmetros de imunidade analisados. O gráfico bidimensional da PCA ilustra que, em geral, as amostras demonstram um pequeno gradiente temporal, com exceção de alguns valores nomeadamente nas EEA realizadas durante (T1) e no final (T2) do ensaio nutricional que estão dispersos dos restantes (Figura 20).

Pode observar-se quatro grupos neste gráfico. O primeiro grupo (T0CT, T03A, T0CA e o ponto disperso T024) é caracterizado por uma correlação oposta entre a

percentagem de fagócitos e a percentagem de granulócitos incolores, e entre a percentagem de granulócitos vermelhos e a concentração de lisozima. O segundo grupo (T1CT, T13A, T1CA e o ponto disperso T124) é caracterizado por uma correlação positiva entre a concentração protease e a percentagem de granulócitos incolores. Em contraste é caracterizado por uma correlação oposta entre a atividade da protease e a percentagem de células vibráteis e concentração lisozima. O terceiro grupo (T224, T2CT) é caracterizado por uma correlação positiva entre a percentagem de granulócitos incolores, percentagem de granulócitos vermelhos e a concentração de lisozima. Em contraste é caracterizado por uma correlação oposta entre a percentagem de granulócitos incolores, vermelhos e fagócitos. O quarto grupo (T23A, T2CA) é caracterizado por uma correlação positiva entre a percentagem de células vibráteis e a concentração de lisozima. Em contraste é caracterizado por uma correlação oposta entre a percentagem de células vibráteis e a atividade da protease (Figura 20).

Em geral pode observar-se que os granulócitos vermelhos e incolores foram os parâmetros que apresentaram uma correlação positiva mais forte, seguido pela relação entre os granulócitos vermelhos e a lisozima e por último entre a lisozima e os granulócitos incolores (Figura 20).

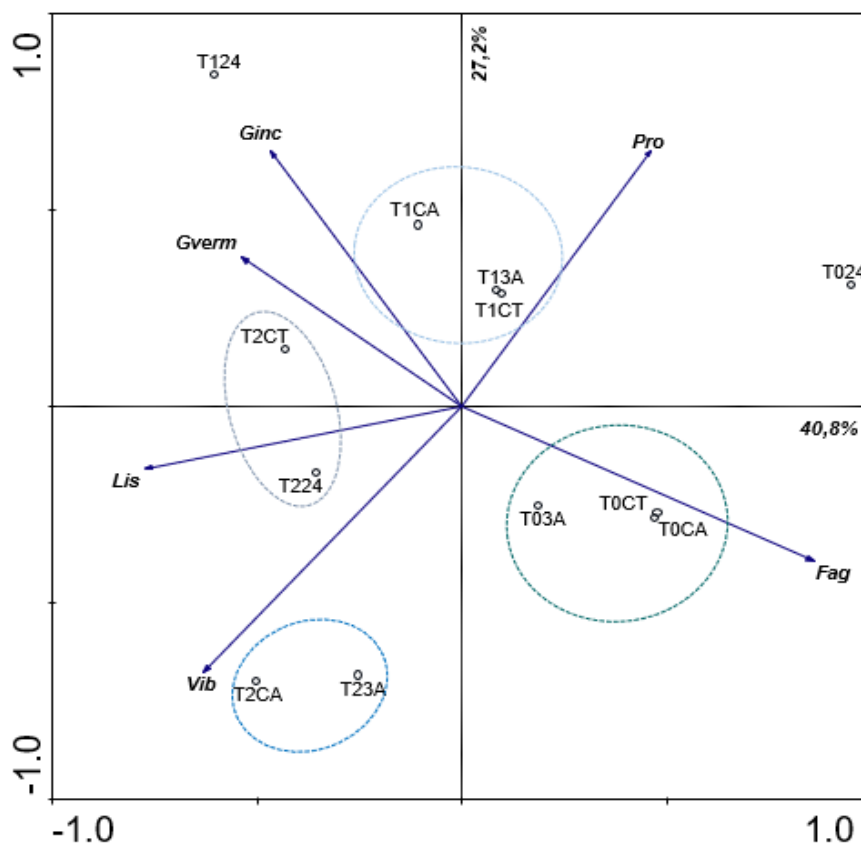


Figura 20- Gráfico bidimensional de componentes principais da correlação entre parâmetros de imunidade celular e parâmetros de imunidade humoral utilizados para caracterizar a resposta imune dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com a ração vegetal. Cada vetor representa um dos parâmetros analisados (percentagem de fagócitos- *fag*, percentagem de

granulócitos incolores-Ginc, percentagem de granulócitos vermelhos-Gverm, percentagem de células vibráteis-vib, concentração de lisozima-lis e atividade da protease-pro) e cada ponto representa os grupos amostrais sujeitos a exposição aguda de temperatura (T) e controlo (CT) e concentração elevada de amónia (A) e controlo (CA) no início (T0), durante (T1) e final (T2) do ensaio nutricional de 90 dias.

## **4 Discussão**

### **4.1 Ensaio nutricional**

O declínio dos stocks comerciais de *P. lividus* em águas europeias e a procura crescente do mercado por gónadas de ouriços-do-mar tem estimulado o interesse no potencial desta espécie para aquacultura (Byrne, 1990). Na natureza, os ouriços-do-mar são espécies predominantemente herbívoras e as macroalgas são sua dieta principal (Lawrence, 2013), mas a utilização de dietas artificiais secas promovem maiores rendimentos num cenário produtivo (Lourenço *et al.*, 2019). O valor nutricional e o tipo de alimentação das dietas oferecidas aos ouriços-do-mar também têm um impacto elevado nas taxas de ingestão e conversão alimentar (Fernandez & Boudouresque, 2000; Prato *et al.*, 2018). Dietas artificiais são formuladas com maior nível de proteína do que as macroalgas, permitindo que os ouriços utilizem mais energia para a produção de gónadas. Este resultado é atribuível à intensificação da gametogénese e ao armazenamento de fagócitos nutritivos compatíveis com a acumulação de nutrientes antes do início da gametogénese (Prato *et al.*, 2018).

A eficiência das dietas usadas para a manutenção e crescimento dos ouriços-do-mar foi avaliada com recurso à evolução de três parâmetros biométricos: o diâmetro, o peso total e o índice gonadossomático. Em termos de diâmetro, este manteve-se relativamente constante ao longo do ensaio nutricional, com ambos os grupos alimentados com a macroalga e com a ração vegetal mostrando gamas de diâmetros semelhantes. Estes resultados são expectáveis, uma vez que na gama de diâmetros selecionada para realizar este trabalho, a taxa de crescimento somático é muito lenta e não seria expectável observar um crescimento de diâmetro significativo num ensaio nutricional relativamente curto como este. No que diz respeito ao peso total dos ouriços-do-mar, foram observadas variações significativas de peso entre os ouriços-do-mar alimentados com as duas dietas e ao longo do tempo. Os ouriços-do-mar alimentados com a macroalga apresentaram um peso significativamente mais elevado no início, mas durante e no final do ensaio o peso foi mais baixo do que os ouriços alimentados com a ração vegetal. Estes resultados não foram os esperados, normalmente seria expectável observar um aumento do peso, ao longo do tempo e não uma diminuição, como ocorreu nos indivíduos alimentados com a macroalga. Os ouriços-do-mar foram alimentados 3x por semana, tendo com uma quantidade de alga igual a 5% da biomassa total no tanque

e para a ração, a taxa de ingestão voluntária de *pellets* ( $0,60 \pm 0,04g$ ), logo os resultados apresentados, muito dificilmente poderiam ser explicados pela falta de alimento podem, contudo, ser explicados pela recolha aleatória dos ouriços-do-mar dos tanques.

O índice gonadossomático (IG) é um indicador do estado fisiológico individual e reflete a maturação das gónadas. Na verdade, as análises histológicas apoiam que, o IG elevado geralmente, evidencia a maturação das gónadas e o aumento de reservas energéticas (Walker *et al.*, 2007).

Fernandez-Boo *et al.*, (2018) relatou que os dados do IG se correlacionam com diversos os parâmetros imunológicos, incluindo a atividade bactericida contra *V. anguillarum* e *P. damselae*, lisozima, óxido nítrico, atividade hemolítica, conteúdo de proteínas e protease e, apenas a atividade bactericida contra *V. anguillarum* e a atividade hemolítica estão positivamente correlacionadas com o IG. Apesar da maior parte dos parâmetros não estarem positivamente correlacionados parece que o período de desova pode ter uma forte influência no estado imunológico do animal devido à perda de energia (Arizza *et al.*, 2013).

Os resultados mostram que os ouriços-do-mar alimentados com a macroalga apresentaram um aumento do IG entre o início do ensaio e a amostragem intermédia, seguido de um decréscimo no final do ensaio. Por outro lado, os ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal apresentaram um aumento significativo do IG ao longo de todo o ensaio nutricional. Os resultados obtidos nos indivíduos alimentados com a macroalga são esperados, apesar de a dieta natural dos ouriços ser macroalgas (Lawrence, 2013), sabe-se que estas dietas não são tão eficientes no crescimento da gónada como as dietas artificiais. Pearce *et al.*, (2002) e Prato *et al.*, (2018) mostram que uma dieta restrita de macroalgas oferece baixos níveis de proteína e energia para sustentar as altas taxas de crescimento e produção de gónadas necessárias para uma produção rentável.

Neste estudo o IG de *P. lividus* alimentados com a macroalga variou entre 2,30% a 3,53%, enquanto o IG do grupo alimentado com a ração vegetal variou entre 2,88% a 12,50%. Apesar de se observar uma diferença no IG médio entre as duas dietas estes valores são inferiores ao indicado por Pearce *et al.*, (2002) onde é referido que *Strongylocentrotus droebachiensis* alimentado com dietas artificiais (com diferentes níveis de proteína animal e vegetal) mostrou valores de IG entre 9,7% a 25,5% mais elevados do que quando alimentado com kelp (*Laminaria longicuris* e/ou *Laminaria*

*digitata*), 9,7% a 15,3%. Apesar dos resultados do nosso estudo serem inferiores, pode observar-se que em ambas a dieta com mais conteúdo proteico promoveu maior IG.

O grupo de ouriços alimentados com macroalga apresentavam gónadas de coloração laranja mais intensa e na ração vegetal a coloração era um laranja bastante pálido. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Prato *et al.*, (2018), onde as dietas formuladas foram eficazes no aumento do tamanho das gónadas, mas pouco eficientes na produção de gónadas com as características organolépticas ideais, principalmente em relação à cor. Kennedy *et al.*, (2005) menciona que dietas ricas em nutrientes tendem a promover a maturação precoce das gónadas, reduzindo as taxas de crescimento e aumentando a produção de gónadas. Por esse motivo, é importante encontrar uma formulação de dieta para os ouriços-do-mar durante a fase de crescimento, que poderá melhorar o crescimento somático e prevenir a maturação precoce das gónadas (Lourenço *et al.*, 2021).

Nos resultados relativos à análise histológica, ao longo dos três tempos, pode observar-se que existiu uma maior variedade de estados de maturação, e a ração vegetal promoveu, em geral, estados de maturação mais avançados. Pode observar-se que em T0 existiam apenas os estados de maturação I e II (recuperação e crescimento), em T1 surgiu o estado de maturação III (prematuro) e em T2 surgiu o estado de maturação VI (pós-desova).

O período máximo de crescimento gonadal de *P. lividus* coincide com a diminuição da temperatura e um fotoperíodo inferior a 12h. Isto sugere que a temperatura e o fotoperíodo podem influenciar o desenvolvimento gonadal (Byrne, 1990). Em aquacultura, não só os indivíduos do mesmo lote de produção devem ser sincronizados sexualmente, mas o seu desenvolvimento gametogénico ideal depende do objetivo desejado, seja ele a reprodução para a obtenção de juvenis para fechar o ciclo produtivo ou para repovoamento, ou para a produção de ovas para o consumo humano (Spirlet *et al.*, 2000). O crescimento somático e gonadal, assim como o ciclo gametogénico dos ouriços-do-mar são influenciados por diversos fatores, apresentando uma forte plasticidade fenotípica. Estes incluem fatores abióticos (como sazonalidade climática, fotoperíodo, temperatura da água, salinidade, hidrodinamismo) e fatores nutricionais (Byrne, 1990).

Durante e no final do ensaio ocorreu a desova de alguns indivíduos, do grupo alimentado com a ração vegetal, o que pode ter influenciado a variedade de estados de maturação encontrados nestes dois momentos de amostragem. A desova também

coincidiu com a mudança dos indivíduos, dos tanques para os aquários de 5L (experiência de exposição aguda), onde o fotoperíodo foi reduzido substancialmente, estas observações são suportadas pelo estudo de Shpigel *et al.*, (2004) onde os resultados indicaram que a gametogénese pode ser controlada pelo fotoperíodo. Escuridão ou dias curtos aumentaram a gametogénese e quando o fotoperíodo foi prolongado (exposição à luz de 16 horas ou durante o período de verão). Arizza *et al.*, (2013) e Fernandez-Boo *et al.*, (2018) relataram que um período de desova acentuado pode provocar uma imunossupressão do estado imunológico devido à perda de energia, porque as gónadas não são apenas um órgão reprodutivo, mas também o principal reservatório de energia.

## **4.2 Experiências de exposição aguda a fatores de stress ambiental**

### **4.2.1 Teste comportamental**

A capacidade dos ouriços-do-mar de corrigirem a sua posição em relação ao plano é um reflexo da coordenação do sistema neuromuscular em resposta a uma mudança dramática na orientação (Kleitman, 1941). Respostas corretivas afetam a capacidade do indivíduo de sobreviver quando deslocado por predadores ou por ondulação forte (Hu *et al.*, 2020). Por isso, a resposta de endireitamento tem sido utilizada como um indicador de bem-estar do organismo de ouriços-do-mar em aquacultura e expostos a uma variedade de fatores, incluindo poluentes químicos, temperaturas elevadas, salinidade reduzida e alta pressão de CO<sub>2</sub> (Challener & McClintock, 2013; Wei *et al.*, 2016).

As respostas de endireitamento observadas variaram entre os 01:07 e os 03:13 minutos com um padrão pouco acentuado. A diversidade de respostas de endireitamento ao longo do ensaio nutricional poderá dever-se à condição individual de cada ouriço e ao curto tempo de amostragem. No entanto, podem ser identificadas algumas tendências, nomeadamente, nos ouriços alimentados com a ração vegetal.

Os ouriços-do-mar alimentados com a macroalga e expostos à temperatura elevada apresentaram uma resposta de endireitamento mais longa em relação ao grupo controlo no início e durante o ensaio nutricional. No final do ensaio nutricional a resposta diminuiu, contudo foi semelhante em relação ao grupo controlo. Os ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal e expostos à temperatura elevada apresentaram uma resposta de endireitamento semelhante em relação ao grupo controlo no início e significativamente mais longa durante o ensaio nutricional, mas no final do ensaio a resposta foi mais rápida em relação ao controlo.

Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes ao estudo realizado por Brothers & McClintock (2015), onde relatam que a resposta de endireitamento envolve o movimento coordenado dos pés tubulares e dos espinhos. Com o aumento da temperatura, os pés ambulacrários do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* perdem sua capacidade de aderir ao substrato, contrair e inibir a resposta de correção e quando expostos a temperaturas extremas (32°C e 34°C) os ouriços experienciam perda de espinhos. Segundo Lawrence, (1975), no entanto, ouriços-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus* exibiram respostas de endireitamento mais rápidas em condições combinadas de temperatura e salinidade fora dos intervalos experimentados no meio natural. Após exposições de 24h a 22°C, 28°C e 34°C, a capacidade de correção de *L. variegatus* é maior após exposição aguda a 28°C.

Os resultados mostram que os ouriços-do-mar alimentados com a macroalga e expostos à concentração de amônia elevada apresentaram uma resposta de endireitamento mais longa em relação ao grupo controle no início do ensaio nutricional. Na experiência realizada durante o ensaio nutricional, observou-se uma resposta de endireitamento semelhante, porém na experiência realizada no final do ensaio nutricional esta foi mais longa neste grupo de ouriços-do-mar. No entanto, os ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal e expostos à concentração de amônia elevada apresentaram uma resposta de endireitamento mais rápida em relação ao grupo controle no início, durante e no final do ensaio nutricional.

DeWhatley (2018), relata que a poluição por amônia pode interromper comportamentos e mecanismos fisiológicos. Existem várias implicações dos impactos de concentrações elevadas de NH<sub>3</sub> no gastrópode *Elimia semicarinata*, uma vez que uma resposta de endireitamento mais lenta pode custar tempo de alimentação e pode aumentar a exposição a predadores. Por exemplo, os caracóis normalmente endireitam-se mais rapidamente quando sentem o cheiro do predador. Quando expostos a uma concentração elevada de amônia, a capacidade de sentir o odor do predador é reduzida tornando a resposta de endireitamento mais lenta. Wei *et al.*, (2016) sugerem que os ouriços-do-mar com uma resposta de endireitamento mais rápida têm melhor atividade alimentar. Isso indica que indivíduos com uma resposta de endireitamento mais rápida não só tem maior capacidade de evitar distúrbios abióticos e predação, mas também têm a vantagem de aumentar o consumo de alimentos, sendo que o consumo de alimentos está entre os fatores mais importantes que afetam o crescimento e a reprodução em ouriços-do-mar, estes fatores são importantes para a produção aquícola.

Comparando os resultados dos dois fatores de exposição, pode observar-se que os ouriços-do-mar expostos ao aumento brusco da temperatura mostram, em geral, respostas de endireitamento mais longas do que os ouriços sujeitos a amónia elevada. A alimentação à base de macroalga promoveu, em geral, respostas de endireitamento mais longas e a ração vegetal promoveu respostas de endireitamento mais rápidas nos indivíduos expostos à temperatura e concentração de amónia elevada quando comparados com os indivíduos do controlo.

É de notar que durante todas as experiências de exposição aguda realizadas os ouriços-do-mar estiverem expostos a uma intensidade de luz baixa. De acordo com Sun *et al.*, (2019), a intensidade de luz alta prolongou significativamente o tempo de resposta de endireitamento de *S. intermedius*, variando entre 50 segundos (pouca luz) e 200 segundos (muita luz). Como os pés ambulacrários ao redor da região aboral são mais fotossensíveis, o comportamento de endireitamento reduzido quando expostos a elevada intensidade de luz pode ser explicado pela capacidade decrescente dos pés tubulares de aderir ao substrato, inibindo o comportamento de endireitamento.

#### **4.2.2 Parâmetros de imunidade celular**

O número de celomócitos, a percentagem de cada tipo de célula e muitas respostas funcionais, variam de acordo com a espécie, condição fisiológica, assim como em resposta a fatores ambientais, poluentes, patógenos ou lesões acidentais (Marceta *et al.*, 2020). De uma forma geral, os fagócitos são as células imunes mais abundantes no fluido celómico dos ouriços-do-mar da espécie *P. lividus* (Gross *et al.*, 1999; Arizza *et al.*, 2013). Neste estudo observou-se cerca de 31 a 52% de fagócitos e granulócitos incolores e cerca de 2 a 12% de granulócitos vermelhos e células vibráteis. As percentagens de células imunes presentes no FC dos ouriços-do-mar analisados neste trabalho são diferentes daqueles obtidos por Arizza *et al.*, (2013). Naquele estudo, os autores observaram que o FC de *P. lividus* selvagens contém aproximadamente 80% de fagócitos, 8% de granulócitos incolores, 5% de granulócitos vermelhos e 7% de células vibráteis. Pode observar-se que os ouriços selvagens apresentam um maior desequilíbrio entre as percentagens fagócitos e granulócitos incolores do que os ouriços de cativeiro.

Esta diferença pode dever-se à exposição mais intensa, por parte dos ouriços-do-mar selvagens, a fatores ambientais e a uma variedade de patógenos mais agressiva, sendo necessário aumentar ainda mais a produção destas células para uma eliminação mais eficaz das potenciais ameaças. Segundo Arizza *et al.*, (2013), os fagócitos exibem atividade fagocítica associada à eliminação de bactérias, partículas estranhas e

proteínas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, daí a percentagem destas células ser maior nos ouriços-do-mar das populações selvagens. Por outro lado, os granulócitos incolores contêm e podem libertar moléculas citolíticas e sua atividade é aumentada na presença de fagócitos.

As segundas células mais abundantes no fluído celómico de *P. lividus* são os granulócitos incolores e vermelhos (Matranga *et al.*, 2006). A sua função parece estar associada à recuperação de ferimentos ou ao ataque a materiais estranhos. No presente estudo, que a percentagem destas células imunes era particularmente elevada quando comparada com estudos realizados com ouriços-do-mar selvagens. O facto destas células aparecerem em maior percentagem nestes indivíduos, pode dever-se a estas serem um tipo de célula que ocorre quando estes não estão tão expostos a fatores ambientais ou uma elevada variedade de agentes patogénicos. Contudo, não foram encontrados outros estudos que afirmem qual a função dos granulócitos incolores, apenas especulações. São necessários mais estudos que confirmem a função das diferentes células imunes em ouriços-do-mar expostos tanto a fatores de stress abióticos assim como a diferentes agentes patogénicos.

Relativamente às experiências de exposição aguda a temperatura elevada realizadas ao longo do ensaio nutricional, observou-se que a dieta à base de macroalga promoveu o aumento na percentagem de granulócitos incolores e vermelhos e a diminuição na percentagem de fagócitos e vibráteis no FC dos ouriços-do-mar. Por outro lado, a dieta à base da ração vegetal promoveu, em geral, o aumento na percentagem de fagócitos e granulócitos vermelhos e a diminuição na percentagem de granulócitos incolores e células vibráteis, quando comparados com os respetivos grupos de controlo. Os resultados observados vão de encontro àqueles descritos por Branco *et al.*, (2013). Através da realização da contagem total de celómocitos, Branco *et al.*, (2013) observaram que a percentagem de fagócitos do FC de *Echinometra lucunter* é mais baixa quando são expostos a 25°C durante 24h, cerca de 60,20% e a percentagem de granulócitos incolores é mais elevada, cerca de 5,20%. Este relata que a percentagem de granulócitos vermelhos aumentou com o aumento brusco de temperatura, a percentagem quando os ouriços são expostos a 25°C durante 24h foi de 6.20% e a percentagem de células vibráteis é mais elevada, cerca de 28.40%. Isso sugere que os granulócitos vermelhos são um tipo de célula que desempenha um papel importante na resposta imune inata dessa espécie, aumentando em casos de stress, como foi proposto anteriormente por Matranga *et al.*, (2000). Branco *et al.*, (2013) refere também que os granulócitos incolores têm as mesmas funções dos granulócitos vermelhos. Porém,

encontram-se apenas em estados de maturação diferentes e a diferença na densidade de eletrões dos grânulos contidos no interior das células. Com exceção dos fagócitos e granulócitos vermelhos (20°C e 30 °C), as restantes células apresentaram percentagens mais elevadas a 25°C em comparação com 20°C e 30°C, isto pode significar que uma exposição a 25°C por 24h parece afetar mais em relação a 20°C e 30°C.

Tal como *Paracentrotus lividus*, *Echinometra lucunter* habita zonas intertidais de costas rochosas, tornando-os mais expostos às variações térmicas ao longo do dia. Quando comparados com *L. variegatus*, espécie subtidal e menos exposta à oscilação térmica, estes apresentam maior resistência à variação dos parâmetros ambientais (Branco *et al.*, 2013). Estes resultados podem explicar os resultados obtidos neste estudo, *P. lividus* também é uma espécie intertidal que está mais exposta a variações térmicas, o que lhe confere uma maior resistência, que por consequente, uma exposição de 24h a um aumento brusco da temperatura possa não ser suficiente para causar uma mudança significativa no sistema imunológico dos ouriços-do-mar, sendo necessário períodos de exposição mais elevados.

Relativamente aos resultados, do FC dos indivíduos expostos à concentração de amónia elevada das duas dietas estes demonstram uma tendência semelhante entre si. A dieta de macroalga, em geral, promoveu um aumento na percentagem de granulócitos incolores e vermelhos e uma diminuição na percentagem de fagócitos e células vibráteis. A dieta à base de ração vegetal promoveu, em geral, um aumento na percentagem de fagócitos e granulócitos incolores e uma diminuição na percentagem de granulócitos vermelhos e vibráteis, quando comparados com os indivíduos controlo, ao longo do tempo.

Le Moullac & Haffner, (2000), relataram quando expostos a concentrações de amónia idênticas às usadas no presente trabalho, o camarão-azul *Litopenaeus stylirostris* diminuiu a percentagem de celomócitos em 50% em 24 horas, estes dados suportam parte dos resultados obtidos neste estudo, pois as percentagens entre o grupo de indivíduos expostos a à concentração de amónia elevada e o grupo controlo são variáveis, ou seja, cada tipo de célula apresenta aumentos e diminuições entre EEA e entre grupos expostos e não expostos (controlo).

Provavelmente para a obtenção de resultados mais precisos, os ouriços do nosso estudo deveriam ter sido expostos a uma concentração de amónia ou mais elevada, ou durante mais tempo. Todos estes fatores também podem ajudar a explicar as todas as diferenças obtidas nas percentagens dos indivíduos expostos e do controlo no presente

estudo. Brothers *et al.*, (2016) relataram que exposições mais longas a condições do futuro próximo poderão ter um impacto maior sobre os tipos de celomócitos do que exposições mais curtas.

#### **4.2.3 Parâmetros de resposta humoral**

Na verdade, não apenas a temperatura e a salinidade podem afetar o estado imunológico do ouriço-do-mar. Outros fatores, tais como dieta, hidrodinamismo, fotoperíodo ou ciclo reprodutivo também podem afetar a resposta imune destes organismos (Fernandez-Boo *et al.*, 2018). Todos estes fatores podem provocar uma grande variação na resposta humoral em condições muito específicas e a curto-prazo, principalmente no seu conteúdo enzimático. Estudos sobre o estado imunológico de *P. lividus* foram recentemente introduzidos para descobrir mecanismos da resposta imune e imunotoxicidade, nomeadamente, para pesquisas imunológicas, incluindo resistência e plasticidade a mudanças ambientais (Fernandez-Boo *et al.*, 2018). As lisozimas representam uma classe de enzimas que ocorrem em vertebrados, invertebrados, bactérias e plantas e são um dos importantes fatores imunológicos não específicos no corpo (Wang *et al.*, 2008).

Para ambos os grupos alimentados com macroalga e com a ração vegetal observou-se que nas EEA iniciais da temperatura elevada, a concentração de lisozima no FC dos ouriços-do-mar é menor nos ouriços expostos em relação aos ouriços do grupo controlo. Na EEA realizada durante o ensaio, a concentração de lisozima foi menor nos ouriços alimentados com a macroalga e maior nos ouriços alimentados com a ração vegetal e na EEA final, a concentração da lisozima foi superior nos ouriços expostos às condições de stress, em ambas as dietas, em relação aos grupos controlo. Estes resultados demonstram um aumento, apesar de não ser muito pronunciado, ao longo do tempo, e a ração vegetal parece promover a ativação da produção de lisozima nos ouriços em relação à macroalga.

Para o grupo alimentado com a macroalga e exposto à concentração de amónia elevada realizada no início do ensaio, observou-se que a concentração de lisozima no FC dos ouriços-do-mar foi significativamente mais baixa no grupo exposto em relação ao controlo. Na EEA intermédia, a concentração de lisozima foi mais baixa no grupo exposto em relação ao controlo e na EEA final do ensaio a concentração de lisozima foi semelhante no grupo exposto em relação ao controlo. Para o grupo alimentado com a ração vegetal, a concentração de lisozima foi semelhante nos indivíduos expostos em relação ao controlo nas três EEA. Estes resultados demonstram um aumento, menor do

que no fator temperatura, ao longo do tempo, e a ração vegetal parece promover também a ativação da produção de lisozima nos ouriços em relação à macroalga.

Comparando os dois fatores, pode observar-se que a exposição à temperatura elevada apresenta concentrações de lisozima semelhantes em comparação com o fator amónia. Contudo, pode observar-se que nos indivíduos expostos ao fator temperatura a ração vegetal promoveu, em geral, concentrações de lisozima mais elevadas em comparação com a macroalga, nos indivíduos expostos ao fator amónia as concentrações foram semelhantes entre as duas dietas.

Ao nosso conhecimento, é o primeiro estudo que analisa a concentração de lisozima em ouriços sujeitos a condições de stress de temperatura e concentrações elevadas de amónia. As concentrações de lisozima determinadas neste estudo variaram entre 0,53 e 2,18  $\mu\text{g/mL}$ , semelhantes às concentrações determinadas por Fernandez-Boo *et al.*, (2018). Neste estudo, é relatado que a população de *P. lividus* selvagens estudadas sofreram uma diminuição acentuada na concentração de lisozima em março e maio, os valores diminuíram de 1,45  $\mu\text{g/mL}$  para 0,19  $\mu\text{g/mL}$  durante o resto do ano a concentração de lisozima no FC manteve-se estável, em torno de 1,2-1,3  $\mu\text{g/mL}$ . A diminuição acentuada da concentração de lisozima observada por Fernandez-Boo *et al.*, (2018) ocorreu após período de desova entre abril e os primeiros dias de maio. Todavia, pode observar-se que, os grupos expostos apresentaram, em geral, concentrações de lisozima semelhantes ou inferiores em relação ao grupo controlo. Observou-se também que a concentração de lisozima foi mais elevada durante e no final do ensaio, podendo sugerir que, de alguma forma o aumento de lisozima possa estar relacionado com o crescimento gonadal e a desova. Neste estudo ocorreu a desova nos indivíduos alimentados com a ração vegetal durante e no final do ensaio (Janeiro e Fevereiro) mas esta não parece ter influenciado a concentração de lisozima pois esta também aumentou no grupo alimentado com a macroalga e neste grupo não ocorreu desova. As diferenças entre os resultados do nosso estudo e este pode dever-se ao facto de os ouriços deste estudo serem selvagens e os nossos serem provenientes de cativeiro, nomeadamente, na exposição a fatores ambientais adversos e potenciais ataques de patógenos, onde os ouriços selvagens têm uma exposição muito maior comparativamente aos de cativeiro e na disponibilidade de alimento no meio.

As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas (Homaei *et al.*, 2016). Para ambos os grupos alimentados com macroalga e com a ração vegetal observou-se que nas EEA do aumento brusco da temperatura realizadas início

a percentagem de protease é mais elevada e durante e no final do ensaio, a percentagem de protease é menor nos ouriços expostos em relação aos ouriços do grupo controlo.

Para ambos os grupos alimentados com macroalga e com a ração vegetal, expostos à concentração de amónia elevada, observou-se que no início do ensaio a percentagem de protease é semelhante e menor, respetivamente, em relação ao controlo. Na EEA intermédia a percentagem de protease aumentou no grupo alimentado com a macroalga, mas no grupo alimentado com a ração esta percentagem diminuiu em relação ao controlo e na EEA final do ensaio nutricional a percentagem de protease foi semelhante no grupo alimentado com a macroalga e aumentou no grupo alimentado com a ração vegetal, em relação ao controlo.

Tal como para os outros parâmetros humorais analisados, este, ao nosso conhecimento, é o primeiro estudo que analisa a atividade da protease em ouriços sujeitos a condições de stress de temperatura e concentrações elevadas de amónia. Pode observar-se que, sob condições de stress, a atividade da protease no FC dos ouriços-do-mar alimentados com ambas as dietas apresentaram percentagens de protease semelhantes entre si, apesar da ração vegetal (31,32%) possuir maior conteúdo proteico do que a macroalga (18,12%). Estes resultados são semelhantes ao estudo de Jonhston *et al.*, (2005), onde estes relataram que embora seja geralmente aceite que a atividade da protease mais elevada reflete a alimentação com uma dieta carnívora, outros estudos também descobriram atividade proteolítica elevada em omnívoros. A alface-do-mar (*Ulva lactuca*), que é ingerida em grandes quantidades por *L. variegatus*, é rica em proteínas (15% de matéria orgânica). Fernandez-Boo *et al.*, (2018) relatou que, a atividade máxima de protease, em *P. lividus* foi medida em julho de 2016, cerca de 11,02% enquanto a mínima foi medida em janeiro de 2017, cerca de 0,71%. Estes resultados são inferiores aos resultados do nosso estudo, que demonstraram percentagens de protease mais elevadas, entre 12,0 e 18,0%, estes valores podem ser explicados devido à alimentação dos ouriços em cativeiro ser controlada e com um conteúdo proteico mais elevado do que a alimentação encontrada no meio selvagem. Percentagens mais baixas de protease, podem indicar um sistema imunológico mais ativo, pois como já referido anteriormente, as proteases são importantes fatores de virulência e muitos inibidores de protease protegem os hospedeiros ao inativar positivamente as proteases de patógenos. A protease não parece ter relação com o período de desova, visto que os períodos de aumento e diminuição não coincidem com a altura da mesma.

O óxido nítrico (ON) é um radical de vida curta, gerado pelas sintases de óxido nítrico (SON). Tal como o anião superóxido, o ON desempenha um papel importante na eliminação de patógenos como parte da resposta imune inata. O ON não é tóxico, desempenhando um papel importante como molécula sinalizante em todo o reino animal. Mas ao reagir com o anião superóxido, forma o anião peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que é um composto altamente tóxico com propriedades antibacterianas e atividade antiviral (Ellis *et al.*, 2011). Costa *et al.*, (2009) demonstrou que o ON é ao mesmo tempo um fator indutor e induzível na resposta imune de invertebrados.

Tal como para os outros parâmetros humorais analisados, este, ao nosso conhecimento, é o primeiro estudo que analisa a produção de óxido nítrico em ouriços sujeitos a condições de stress de temperatura e concentrações elevadas de amónia. Os resultados obtidos neste estudo variaram entre 0,14 e 2,59 µM/mL. Contudo, é importante realçar que apenas ocorreu produção de ON num total de 16 ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal, e que nestes, os indivíduos expostos a um aumento brusco de temperatura demonstraram uma produção de ON mais elevada, na EEA intermédia, de  $2,59 \pm 2,44$  µM/mL e na EEA final, de  $1,88 \pm 3,26$  µM/mL do que os indivíduos expostos à concentração de amónia elevada na EEA intermédia, de  $0,77 \pm 1,33$  µM/mL e na EEA final, de  $0,15 \pm 0,28$  µM/mL.

A concentração de ON observada no FC dos ouriços-do-mar foi em geral menor que os níveis de ON determinados por Fernandez-Boo *et al.*, (2018). No seu estudo, Fernandez-Boo *et al.*, (2018) observou que o conteúdo máximo de ON foi medido em maio de 2016, cerca de 15,76 µM/mL e o valor mínimo foi medido em fevereiro de 2017, cerca de 1,55 µM/mL. O número reduzido de indivíduos torna difícil obter comparações fiáveis, mas pode-se observar que no estudo de Fernandez-Boo *et al.*, (2018) o conteúdo máximo de ON em *P. lividus* foi medido num período pós-desova e visto que a desova no nosso estudo apenas ocorreu durante e no final do ensaio, tal como a produção de ON, talvez esta também possa estar associada a um evento pós-desova que cause impacto no sistema imune e as diferenças obtidas pode dever-se ao facto de os ouriços do nosso estudo serem provenientes de cativeiro e ao facto de o ambiente onde se encontram inibir a produção de óxido nítrico, ou ser necessário um tempo de exposição mais longo para a ativação do mesmo, também se pode especular que o ON apenas é ativado quando há um patógeno presente no organismo. Serão necessários mais estudos aprofundados nestes temas para que se possa validar os pressupostos referidos anteriormente.

### **4.3 Correlação entre imunidade celular e humoral**

Os resultados obtidos na análise de componentes principais (PCA), demonstram correlações entre os parâmetros de imunidade celular e de resposta humoral. Nos indivíduos alimentados com a macroalga, pode observar-se que a lisozima e as células vibráteis foram os parâmetros que apresentaram uma correlação positiva mais forte, e os fagócitos e os granulócitos incolores apresentaram uma correlação oposta mais forte. Enquanto nos indivíduos alimentados com a ração vegetal, pode observar-se que os granulócitos vermelhos e incolores foram os parâmetros que apresentaram uma correlação positiva mais forte e os fagócitos e os granulócitos vermelhos apresentaram uma correlação oposta mais forte.

Esta análise forneceu mais informação sobre a correlação entre os parâmetros de imunidade celular e de resposta humoral. Pode observar-se que existem correlações diferentes nas duas dietas, sendo as correlações mais significativas na macroalga entre a lisozima e as células vibráteis e na ração vegetal entre os granulócitos vermelhos e os incolores. Estas correlações são diferentes entre dietas inferindo que as dietas podem ter um impacto mais significativo nos parâmetros de resposta imune, nomeadamente a dieta com maior conteúdo proteico poderá favorecer/ ativar a produção destas células imunes. Contudo são necessários mais estudos sobre o impacto das dietas na resposta imune. Os dois fatores de stress ambiental (temperatura e amónia) distribuem-se de forma semelhante nas duas dietas e pode observar-se um ligeiro gradiente temporal, apesar de existirem pontos dispersos dos restantes, podendo indicar uma resposta imune mais rápida ao longo do tempo, contudo não foram encontrados outros estudos para comprovar os resultados obtidos. No futuro serão necessários mais estudos para melhor compreensão destas correlações e se o alimento fornecido influencia as mesmas.

## **5 Conclusão**

Os resultados obtidos no ensaio nutricional demonstraram que, indivíduos alimentados com a ração vegetal obtiveram maior índice gonadossomático e as análises histológicas demonstraram, a existência de uma maior variedade de estados de maturação ao longo do tempo, contudo estes são semelhantes entre dietas. Estes resultados demonstram que ambas as dietas promoveram o desenvolvimento da gónada, mas em escalas diferentes, ou seja, ambas as dietas parecem ter promovido o desenvolvimento saudável dos ouriços, mesmo que o IG obtido seja diferente. E isto é importante para estabelecer uma base em que ambas as dietas são adequadas.

Para o desenvolvimento deste trabalho, teve-se em conta quais os parâmetros da qualidade da água que mais afetariam o estado fisiológico e o sistema imune dos ouriços-do-mar em contexto de aquacultura. Para isso recorremos a vários estudos, já referidos ao longo do trabalho (ex.: Arafa *et al.*, 2006; Branco *et al.*, 2013; Girard *et al.*, 2011 Liu & Chen 2004; Siikavuopio *et al.*, 2004) onde é referido que a temperatura e a amónia encontram-se dentro dos fatores ambientais que são bastante debilitantes e por vezes até fatais para os ouriços-do-mar produzidos em aquacultura.

Os resultados obtidos nas experiências de exposição aguda demonstraram que, quando expostos à concentração de amónia elevada, os ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal tendem a ser mais rápidos na resposta de endireitamento o que pode conferir uma vantagem competitiva e beneficiar a alimentação, uma vez que estes só se alimentam quando na sua posição normal, com a face oral virada para baixo.

Nos resultados relativos à contagem de células imunes no FC dos ouriços-do-mar pode observar-se que, entre fatores esta foi semelhante, os ouriços-do-mar alimentados com a macroalga promoveram a produção de granulócitos incolores e vermelhos em ambos os fatores e os ouriços-do-mar alimentados com a ração vegetal promoveram a produção de fagócitos e granulócitos vermelhos no fator temperatura e a produção de fagócitos e granulócitos incolores no fator amónia.

Os resultados obtidos nos parâmetros de resposta humoral demonstraram que, o FC dos indivíduos expostos à temperatura elevada e alimentados com a ração vegetal apresentaram um aumento na produção de óxido nítrico. Por outro lado, a concentração de lisozima foi semelhante nos indivíduos expostos aos dois fatores e um pouco mais elevada nos indivíduos alimentados com a ração vegetal apenas no fator temperatura. Já a atividade da protease foi suprimida nos ouriços expostos a ambos os fatores de stress quando comparados com o grupo controlo independentemente da dieta usada.

Através dos resultados obtidos, as diferenças nos parâmetros de imunidade celular e humoral podem ser explicadas pela variabilidade de cada indivíduo e devido ao stress provocado pela realização das experiências. A temperatura demonstrou ser um fator mais debilitante do que a amónia, e a ração vegetal promoveu uma resposta imune mais ativa em relação à macroalga. Pode observar-se que os testes comportamentais e os parâmetros humoral apresentaram respostas mais rápidas e mais eficazes em comparação com os parâmetros de imunidade celular, pelo menos para estas exposições curtas de 24 horas.

Em estudos futuros será de interesse maior continuar a observar os impactos negativos causados pela temperatura e amônia em espécies de ouriços-do-mar em cativeiro, assim como o impacto de mais fatores como o oxigênio dissolvido, turbulência da água, o pH e a salinidade, bem como o impacto que estes fatores possam causar quando interagem uns com os outros no sistema imunológico, mais concretamente, nos parâmetros de imunidade celular e de resposta humoral, bem como na sua condição física e atividade alimentar.

## 6 Referências

- Albrizio, M., Aiudi, G., Cicirelli, V., Guaricci, A. C., Passantino, G., Di Summa, A., & Zizzo, N. (2019). Male reproductive physiology of *Paracentrotus lividus*: monthly and seasonal evaluations to study the effects of the environment on gonadal development and sperm cells kinetic. *Aquaculture*, 503(December 2018), 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.016>
- Andrew, N. L., Agatsuma, Y., Ballesteros, E., Bazhin, A. G., Creaser, E. P., Barnes, D. K. A., Botsford, L. W., Bradbury, A., Campbell, A., Dixon, J. D., Einarsson, S., Gerring, P. K., Hebert, K., Hunter, M., Hur, S. B., Johnson, C. R., Juinio-Meñez, M. A., Kalvass, P., Mileer, R. J., Moreno, C. A., Palleiro, J. S., Rivas, D., Robinson, S. M. L., Schroeter, S. C., Steneck, R. S., Vadas, R. L., Woodby, D. A. & Xiaoqi, Z. (2002). Status and Management of World Sea Urchin Fisheries. <https://doi.org/10.1201/9780203180594.ch7>
- Arafa, S., Sadok, S., & El Abed, A. (2006). Variation in nitrogenous compounds and gonad index in fed and starved sea urchins (*Paracentrotus lividus*) during live storage. *Aquaculture*, 257(1–4), 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.040>
- Arizza, V., Giaramita, F. T., Parrinello, D., Cammarata, M., & Parrinello, N. (2007). Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 147(2 SPEC. ISS.), 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.022>
- Arizza, V., Vazzana, M., Schillaci, D., Russo, D., Giaramita, F. T., & Parrinello, N. (2013). Gender differences in the immune system activities of sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 164(3), 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.021>
- Arizzi, A. N., Picone, M., Losso, C., & Volpi Ghirardini, A. (2003). Ammonia as confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Toxicological and Environmental Chemistry*, 85(4–6), 183–191 <https://doi.org/10.1080/02772240410001665418>
- Asnaghi, V., Collard, M., Mangialajo, L., Gattuso, J. P., & Dubois, P. (2018). Bottom-up effects on biomechanical properties of the skeletal plates of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in an acidified ocean scenario. *Marine Environmental Research*, 144, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.12.002>
- Baião, L. F., Rocha, F., Costa, M., Sá, T., Oliveira, A., Maia, M. R. G., Fonseca, A. J. M., Pintado, M. & Valente, L. M. P. (2019). Effect of protein and lipid levels in diets for adult sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture*, 506 (December 2018), 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.005>

- Barros, I., Mendes S., & Domitilia, R. (2016). “*Vibrio Diabolicus* Immunomodulatory Effects on *Bathymodiolus Azoricus* During Long-Term Acclimatization at Atmospheric Pressure.” *Journal of Aquaculture Research & Development* 7(12). doi: 10.4172/2155-9546.1000464.
- Basuyaux, O., & Mathieu, M. (1999). Inorganic nitrogen and its effect on growth of the abalone *Haliotis tuberculata* Linnaeus and the sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck. In *Aquaculture* (Vol. 174). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00510-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00510-9)
- Beck, G., Miller, R., & Ebersole, J. (2014). Mass mortality and slow recovery of *Diadema antillarum*: Could compromised immunity be a factor? *Marine Biology*, 161(5), 1001–1013. <https://doi.org/10.1007/s00227-013-2382-6>
- Bertocci, I., Dominguez, R., Machado, I., Freitas, C., Domínguez Godino, J., Sousa-Pinto, I., Gonçalves, M., & Gaspar, M. B. (2014). Multiple effects of harvesting on populations of the purple sea urchin *Paracentrotus lividus* in north Portugal. *Fisheries Research*, 150, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.10.010>
- Bertocci, I., Blanco, A., Franco, J. N., Fernández-Boo, S., & Arenas, F. (2018). Short-term variation of abundance of the purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), subject to harvesting in northern Portugal. *Marine Environmental Research*, 141, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.09.017>
- Boudouresque, C. F., & Verlaquez, M. (2001). Ecology of *Paracentrotus lividus*. In J. M. Lawrence (Ed.), *Edible sea urchins: Biology and ecology* (pp. 177–216). ISBN 0-444-50390-0.
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2013). *Paracentrotus lividus*. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Vol. 38). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00021-6>
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2020). *Paracentrotus lividus*. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (4th ed., Vol. 43). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00026-3>
- Bower, C. E., & Bidwell, J. P. (1978). Ionization of Ammonia in Seawater: Effects of Temperature, pH, and Salinity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35(7), 1012–1016. <https://doi.org/10.1139/f78-165>
- Branco, P. C., Borges, J. C. S., Santos, M. F., Jensch J., B. E., & da Silva, J. R. M. C. (2013). The impact of rising sea temperature on innate immune parameters in the tropical subtidal sea urchin *Lytechinus variegatus* and the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter*. *Marine Environmental Research*, 92, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.005>
- Brothers, C. J., & J. B. McClintock. (2015). “The Effects of Climate-Induced Elevated Seawater Temperature on the Covering Behavior, Righting Response, and Aristotle’s Lantern Reflex of the Sea Urchin *Lytechinus Variegatus*.” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 467:33–38. doi: 10.1016/j.jembe.2015.02.019.
- Brothers, C. J., Harianto, J., McClintock, J. B. & Byrne, M. (2016) Sea urchins in a high-CO2 world: the influence of acclimation on the immune response to ocean warming and acidification. *Proc. R. Soc. B* 283: 20161501. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2016.1501>

- Brundu, G., & Chindris, A. (2018). Nutrient's uptake and growth of *Ulva lactuca* (Linnaeus, 1753) in grey mullet (*Mugil cephalus*) wastewater versus natural estuarine water. *Chemistry and Ecology*, 34(6), 495–505. <https://doi.org/10.1080/02757540.2018.1452918>
- Brundu, G., Farina, S., & Domenici, P. (2020). Going back into the wild: the behavioural effects of raising sea urchins in captivity. *Conservation Physiology*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa015>
- Byrne, M., (1990). Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*. (Heidelberg, Ger.), 104, 275–289. <https://doi.org/10.1007/bf01313269>
- Canesi, L., & Procházková, P. (2013). The Invertebrate Immune System as a Model for Investigating the Environmental Impact of Nanoparticles. In *Nanoparticles and the Immune System: Safety and Effects*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408085-0.00007-8>
- Canicatti, C. (1991). Binding Properties of *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) Hemolysin. 98, 463–468. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90432-C](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90432-C)
- Carboni, S., Hughes, A. D., Atack, T., Tocher, D. R., & Migaud, H. (2015). Influence of broodstock diet on somatic growth, fecundity, gonad carotenoids and larval survival of sea urchin. *Aquaculture Research*, 46(4), 969–976. <https://doi.org/10.1111/are.12256>
- Carboni, S., Vignier, J., Chiantore, M., Tocher, D. R., & Migaud, H. (2012). Effects of dietary microalgae on growth, survival and fatty acid composition of sea urchin *Paracentrotus lividus* throughout larval development. *Aquaculture*, 324–325, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.037>
- Casal, G., Fernández-Boán, M., Fernández, N., Freire, J., Fernández, L. (2020) Spatial structure and abundance of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in subtidal fishing grounds of the Galician coast (NW-Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 239: 106753
- Castilla-Gavilán, M., Cognie, B., Ragueneau, E., Turpin, V., & Decottignies, P. (2019). Evaluation of dried macrophytes as an alternative diet for the rearing of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture Research*, 50(7), 1762–1769. <https://doi.org/10.1111/are.14045>
- Challener, R. C., & McClintock, J. B. (2013). “Exposure to Extreme Hypercapnia under Laboratory Conditions Does Not Impact Righting and Covering Behavior of Juveniles of the Common Sea Urchin *Lytechinus variegatus*.” *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 46(3):191–99. doi: 10.1080/10236244.2013.800759.
- Cohen-Rengifo, M., Agüera, A., Detrain, C., Bouma, T. J., Dubois, P., & Flammang, P. (2018). Biomechanics and behaviour in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) when facing gradually increasing water flows. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 506(March), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.05.010>
- Cohen-Rengifo, M., Moureaux, C., Dubois, P., & Flammang, P. (2017). Attachment capacity of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in a range of seawater velocities in relation to test morphology and tube foot mechanical properties. *Marine Biology*, 164(4), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3114-0>

- Collard, M., Rastrick, S. P. S., Calosi, P., Demolder, Y., Dille, J. & Findlay, S., B. B. (2015). The impact of ocean acidification and warming on the skeletal mechanical properties of the sea urchin *Paracentrotus lividus* from laboratory and field observations Marine Science. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv018>
- Costa, A. M., Buglione, C.C., Bezerra, F.L., Martins, P. C. C. & Barracco, M.A. (2009). "Immune Assessment of Farm-Reared *Penaeus vannamei* Shrimp Naturally Infected by IMNV in NE Brazil." *Aquaculture* 291(3–4):141–46. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.03.013.
- Cyrus, M. D., Bolton, J. J., Scholtz, R., & Macey, B. M. (2014). The advantages of Ulva (Chlorophyta) as an additive in sea urchin formulated feeds: effects on palatability, consumption, and digestibility. *Aquaculture Nutrition*, 21(5), 578–591. doi:10.1111/anu.12182
- Dang, V. T., Li, Y., Speck, P., & Benkendorff, K. (2011). Effects of micro and macroalgal diet supplementations on growth and immunity of greenlip abalone, *Haliotis laevis*. *Aquaculture*, 320(1–2), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.009>
- Delorme, N. J., & Sewell, M. A. (2016). Effects of warm acclimation on physiology and gonad development in the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 198, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.020>
- DeWhatley, M. C. (2018) "Impacts of ammonia and temperature on freshwater snail behavior and physiology." *Electronic Theses and Dissertations*. Paper 3118. <https://doi.org/10.18297/etd/3118>
- Duchemin, M. B., Fournier, M., & Auffret, M. (2007). "Seasonal Variations of Immune Parameters in Diploid and Triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg)." *Aquaculture* 264(1–4):73–81. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.12.030.
- Dumont, C. P., Drolet, D., Deschênes, I., & Himmelman, J. H. (2007). Multiple factors explain the covering behaviour in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Animal Behaviour*, 73(6), 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.11.008>
- Ellis, R. P., Parry, H., Spicer, J. I., Hutchinson, T. H., Pipe, R. K., & Widdicombe, S. (2011). Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(6), 1209–1222. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.017>
- Elner, R., & Vadas, R. (1990). Inference in Ecology: The Sea Urchin Phenomenon in the Northwestern Atlantic. *The American Naturalist*, 136 (1), 108–125. <https://doi.org/10.1086/285084>
- FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome, 200.
- Feehan, C. J., & Scheibling, R. E. (2014). Effects of sea urchin disease on coastal marine ecosystems. *Marine Biology*, 161(7), 1467–1485. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2452-4>

- Fernandez, C., & Boudouresque, C. F. (2000). "Nutrition of the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) Fed Different Food." *Marine Ecology Progress Series* 204:131–41. doi: 10.3354/meps204131.
- Fernández-Boo, S., Pedrosa-Oliveira, M.H., Afonso, A., Arenas, F., Rocha, F., Valente, L.M.P. & Costas, B. (2018) Annual assessment of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) humoral innate immune status: Tales from the north Portuguese coast, *Marine Environmental Research*, doi: 10.1016/j.marenvres.2018.08.007.
- Ghisaura, S., Loi, B., Biosa, G., Baroli, M., Pagnozzi, D., Roggio, T., Uzzau, S.; Anedda R. & Addis, M. F. (2016). Proteomic changes occurring along gonad maturation in the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Proteomics*, 144, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.035>
- Girard, D., Clemente, S., Toledo-Guedes, K., Brito, A., & Hernández, J. C. (2011). A mass mortality of subtropical intertidal populations of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Analysis of potential links with environmental conditions. *Marine Ecology*, 33(3), 377–385. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2011.00491.x>
- Gizzi, F., Jiménez, J., Schäfer, S., Castro, N., Costa, S., Lourenço, S., José, R., Canning-Clode, J., & Monteiro, J. (2020). Before and after a disease outbreak: Tracking a keystone species recovery from a mass mortality event. *Marine Environmental Research*, 156(February), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104905>
- Gomes, A., Lourenço, S., Santos, P. M., Raposo, A., Mendes, S., Gonçalves, S. C., Ferreira, S. M. F., & Pombo, A. (2021). Effects of single and mixed-diatom diets on growth, condition, and survival of larvae of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture International*, 29(3), 1069–1090. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00676-8>
- Gosselin, P., & Jangoux, M. (1998). From competent larva to exotrophic juvenile: A morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology*, 118(1), 31–43. <https://doi.org/10.1007/s004350050054>
- Grosjean, P., Spirlet, C., Gosselin, P., Vaïtilingon, D., & Jangoux, M. (1998). Land-based, closed-cycle echiniculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinoidea: Echinodermata): A long-term experiment at a pilot scale. *Journal of Shellfish Research*, 17(5), 1523–1531. ISSN 1824-307X
- Gross, P. S., Al-Sharif, W. Z., Clow, L. A., & Smith, L. C. (1999). Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Developmental and Comparative Immunology*, 23(4–5), 429–442. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00022-1)
- Haesaerts, D., Jangoux, M., & Flammang, P. (2003). Study of the perimetamorphic period of the sea star *Asterias rubens* by scanning electron microscopy. In J.-P. Féral & B. David (Eds.), *Echinoderm Research 2001*, 155–159. Lisse: Balkema. ISBN 90 5809 528 2.
- Hernández, M., Bückle, F., Guisado, C., Barón, B., & Estavillo, N. (2004). Critical thermal maximum and osmotic pressure of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* acclimated at different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 29(4–5), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.03.003>
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A. J., Cohen, A. H., Terwilliger, D. P., Buckley, K. M, Brockton, V., Nair, S. V, Berney, K., Fugmann, S. D., Anderson, M. K.,

- Pancer, Z., Cameron, R. A., Smith, L.C. & Rast, J. P. (2006). The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Developmental Biology*, 300(1), 349–365. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.065>
- Homaei, A., Fatemeh L., & Reyhaneh S. (2016). “Development of Marine Biotechnology as a Resource for Novel Proteases and Their Role in Modern Biotechnology.” *International Journal of Biological Macromolecules* 88:542–52. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.023.
- Hu, F., Yang, M., Ding, P., Zhang, Xu., Chen, Z., Ding, J., Chi, X., Luo, J., Zhao, C., & Chang. Y. (2020). “Effects of the Brown Algae *Sargassum horneri* and *Saccharina japonica* on Survival, Growth and Resistance of Small Sea Urchins *Strongylocentrotus intermedius*.” *Scientific Reports* 10(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-020-69435-8.
- Hu, F., Yang, M., Chi, X., Ding, P., Sun, J., Wang, H., Yu, Y., Chang, Y., & Zhao, C. 2021. “Segregation in Multi-Layer Culture Avoids Precocious Puberty, Improves Thermal Tolerance and Decreases Disease Transmission in the Juvenile Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*: A New Approach to Longline Culture.” *Aquaculture* 543.
- Inguglia, L., Chiamonte, M., Arizza, V., Turiák, L., Vékey, K., Drahos, Pitonzo, R.; Avellone, G. & Di Stefano, V. (2020). Changes in the proteome of sea urchin *Paracentrotus lividus* coelomocytes in response to LPS injection into the body cavity. *PLoS ONE*, 15(2), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228893>
- Ivančič, I. & Degobbi, D. (1984) An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method’, *Water Research*, 18(9), pp. 1143–1147. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90230-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90230-6)
- Ivanina, A. V., Chelsea H., & Inna M. S. (2016). “Interactive Effects of Copper Exposure and Environmental Hypercapnia on Immune Functions of Marine Bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*.” *Fish and Shellfish Immunology* 49:54–65. doi: 10.1016/j.fsi.2015.12.011.
- Izzetoğlu, S., Şahar, U., Şener, E., & Deveci, R. (2014). Determination of sialic acids in immune system cells (coelomocytes) of sea urchin, *Paracentrotus lividus*, using capillary LC-ESI-MS/MS. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.029>
- James, P., Evensen, T., & Samuelsen, A. (2017). Commercial scale sea urchin roe enhancement in Norway: Enhancement, transport and market assessment. (April), 22. ISBN: 978-82-8296-490-6
- Jangoux, M. (1981). *Diseases of Echinodermata*. 11. Agents Metazoans (Mesozoa to Bryozoa). Vol. 2.
- Jangoux, M. (1984). Diseases of echinoderms. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 37(1–4), 207–216. <https://doi.org/10.1007/BF01989305>
- Jangoux, M. (1987). *Diseases of Echinodermata. I. Agents microorganisms and protists\** (Vol. 2).
- Johnston, D., & Freeman, J. (2005). “Dietary Preference and Digestive Enzyme Activities as Indicators of Trophic Resource Utilization by Six Species of Crab.” *Biological Bulletin* 208(1):36–46. doi: 10.2307/3593099.

- Johnstone, J., Nash, S., Hernandez, E., & Rahman, M. S. (2019). Effects of elevated temperature on gonadal functions, cellular apoptosis, and oxidative stress in Atlantic sea urchin *Arbacia punctulata*. *Marine Environmental Research*, 149(April), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.05.017>
- Kennedy, E. J., Shawn M. C. Robinson, G. J. Parsons, & John D. C. (2005). “Effect of Protein Source and Concentration on Somatic Growth of Juvenile Green Sea Urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*.” *Journal of the World Aquaculture Society* 36(3):320–36. doi: 10.1111/j.1749-7345.2005.tb00336.x
- Kleitman, N. (1941). The effect of temperature on the righting of Echinoderms. *Biol. Bull.* 80, 292–298. <https://doi.org/10.2307/1537716>.
- Lawrence, J. M. (1975). “The Effect of Temperature-Salinity Combinations on the Functional Well-Being of Adult *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoldea).” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 18(3):271–75. doi: 10.1016/0022-0981(75)90111-2.
- Lawrence, J. M. (2007). *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. (second edition) ISBN-13: 978-0-444-52940-4
- Lawrence, J. M. (2013). *Sea Urchin Life History Strategies*. Vol. 38. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-396491-5.00002-2>
- Le Moullac, G., & Haffner, P. (2000). “Environmental Factors Affecting Immune Responses in Crustacea.” *Aquaculture* 191(1–3):121–31. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00422-1.
- Leite, B. (2019). “The Effects of Three Different Feed Sources on the Somatic and Gonadal Growth of *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).” <http://hdl.handle.net/10400.8/4318>
- Lewis, C., Ellis, R. P., Vernon, E., Elliot, K., Newbatt, S., & Wilson, R. W. (2016). Ocean acidification increases copper toxicity differentially in two key marine invertebrates with distinct acid-base responses. *Scientific Reports*, 6 (September 2015), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep21554>
- Ling, S. D., & Johnson, C. R. (2012). “Marine Reserves Reduce Risk of Climate-Driven Phase Shift by Reinstating Size- and Habitat-Specific Trophic Interactions.” *Ecological Applications* 22(4):1232–45. doi: 10.1890/11-1587.1.
- Liu, C. H., & Chen, J. C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 16(3), 321–334. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(03\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(03)00113-X)
- Lourenço, S., Valente, L. M. P., & Andrade, C. (2019). Meta-analysis on nutrition studies modulating sea urchin roe growth, colour and taste. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 766–781. <https://doi.org/10.1111/raq.12256>
- Lourenço, S., Valente, L. M. P., & Andrade, C. (2020). “Meta-Analysis on Nutrition Studies Modulating Sea Urchin Roe Growth, Colour and Taste.” *Reviews in Aquaculture* 11(3):766–81. doi: 10.1111/raq.12256.
- Lourenço, S., Cunha, B., Raposo, A., Neves, M., Santos, P. M, Gomes, A. S., Tecelão, C., Ferreira, S. M. F, Baptista, T., Gonçalves, S. C., & Pombo, A. (2021). “Somatic Growth and Gonadal Development of *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) Fed with Diets of

Different Ingredient Sources.” *Aquaculture* 539(March). doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736589.

- Luparello, C., Ragona, D., Asaro, D. M. L., Lazzara, V., Affranchi, F., Arizza, V., & Vazzana, M. (2020). Cell-free coelomic fluid extracts of the sea urchin *Arbacia lixula* impair mitochondrial potential and cell cycle distribution and stimulate reactive oxygen species production and autophagic activity in triple-negative MDA-MB231 breast cancer cells. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/jmse8040261>
- Marčeta, T., Matozzo, V., Alban, S., Badocco, D., Pastore, P., & Marin, M. G. (2020). Do males and females respond differently to ocean acidification? An experimental study with the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(31), 39516–39530. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10040-7>
- Martínez, I., García, F.J. & Sánchez, A.I. (2003). Biometric parameters and reproductive cycle of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in three habitats of southern Spain. In: Féral, J.P., David, B. (Eds.), 'Echinoderm Research 2001', Balkema, Lisse, pp. 281–287. ISBN 90 5809 528 2
- Matranga, V. (1996). “Molecular Aspects of Immune Reactions in Echinodermata, “In *Invertebrate Immunology*, vol.15 of *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, pp. 235–247, Springer, Berlin, Germany. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-79735-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79735-4_11)
- Matranga, V., Toia, G., Bonaventura, R., & Mü Ller, W. E. G. (2000). Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. In *Cell Stress & Chaperones* (Vol. 5, Issue 2).
- Matranga, V. (2005). *Marine Molecular Biotechnology Subseries of Progress in Molecular and Subcellular Biology Series Editor*. ISBN 3-540-24402-6 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Matranga, V., Pinsino, A., Celi, M., Di Bella, G., & Natoli, A. (2006). Impacts of UV-B radiation on short-term cultures of sea urchin coelomocytes. *Marine Biology*, 149(1), 25–34. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0212-1>
- Mortensen, A., Siikavuopio, I. S. & James, P. (2012). Water quality requirements for culture of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. 46–50. 198183946
- Onomu, A. J., Vine, N. G., Cyrus, M. D., Macey, B. M. & Bolton, J. J. (2020). The effect of fresh seaweed and a formulated diet supplemented with seaweed on the growth and gonad quality of the collector sea urchin, *Tripneustes gratilla*, under farm conditions. *Aquaculture Research*. 51. 10.1111/are.14752.
- Ouréns, R., Naya, I., & Freire, J. (2014). Mismatch between biological, exploitation, and governance scales and ineffective management of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) fisheries in Galicia. *Marine Policy*, 51, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2014.07.015>
- Pais, A., Chessa, L. A., Serra, S., Ruiu, A., Meloni, G., & Donno, Y. (2007). The impact of commercial and recreational harvesting for *Paracentrotus lividus* on shallow rocky reef sea urchin communities in North-western Sardinia, Italy. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73(3–4), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.02.011>

- Palumbo, A. (2005). Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 142(2), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.05.043>
- Pearce, C. M., Daggett, T. L., & Robinson, S. M. C. (2002). “Effect of Protein Source Ratio and Protein Concentration in Prepared Diets on Gonad Yield and Quality of the Green Sea Urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*.” *Aquaculture* 214(1–4):307–32. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00041-8.
- Pinsino, A., & Matranga, V. (2015). Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. *Developmental and Comparative Immunology*, 49(1), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.013>
- Piryaei, F., Ghavam M. P., Shahbazzadeh, D., & Pooshang B. K. (2018). International Journal of Aquatic Science Cytological study of *Echinometra mathaei* (Echinoidea: Camarodonta: Echinometra) the Persian Gulf sea urchin. 9(2), 77–84. ISSN: 2008-8019 Vol.9, No.2, 77-84,2018
- Prato, E., Fanelli, G., Angioni, A., Biandolino, F., Parlapiano, I., Papa, L., Denti, G., Secci, M., Chiantore, M., Kelly M. S., Ferranti, M. P. & Addis, P. (2018). Influence of a prepared diet and a macroalga (*Ulva* sp.) on the growth, nutritional and sensory qualities of gonads of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 493 (September 2017), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.010>
- Ramirez-Gomez, F. J. & García-Arrarás, J. E., (2010). Echinoderm immunity Abstract Echinoderms are exclusively marine animals that, after the chordates, represent the second largest group of deuterostomes. Their diverse species composition and singular ecological niches provide at the same time challenges. 211–220. ISSN 1824-307X
- Raposo, A. I. G., Ferreira, S. M. F., Ramos, R., Santos, P. M., Anjos, C., Baptista, T., Tecelão, C., Costa, J. L. & Pombo, A. (2019). Effect of three diets on the gametogenic development and fatty acid profile of *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) gonads. *Aquaculture Research*, 50(8), 2023–2038. <https://doi.org/10.1111/are.14051>
- Rato, A., Joaquim, S., Tavares, T. G., Martins, Z. E., Guedes, A. C., Pereira, L. F., Machado, J., Matias, A. M., Gonçalves, J. F. M., Vaz-Pires, P., Magnoni, L. J., Ozório, R. O. A., & Matias, D. (2018). Viability of dietary substitution of live microalgae with dry *Ulva rigida* in broodstock conditioning of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Biology Open*, 7(9). <https://doi.org/10.1242/bio.035923>
- Romano, G., Costantini, M., Buttino, I., Ianora, A., & Palumbo, A. (2011). Nitric oxide mediates the stress response induced by diatom aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *PLoS ONE*, 6(10), 2–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025980>
- Sala, E., & Zabala, M. (1996). Fish predation and the structure of the sea urchin *Paracentrotus lividus* populations in the NW Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 140(1–3), 71–81. <https://doi.org/10.3354/meps140071>
- Santos, P. M., Albano, P., Raposo, A., Ferreira, S. M. F., Costa, J. L. & Pombo, A. (2020). The effect of temperature on somatic and gonadal development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture*, 528, 735487. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735487>

- Sartori, D., & Gaion, A. (2015). Can sea urchins benefit from a dry diet? Physiological and histological assessment for echinoculture feasibility evaluation. *Aquaculture Nutrition*, 22(6), 1214–1221. <https://doi.org/10.1111/anu.12326>
- Shpigel, M., McBride, S. C., Marciano, S., & Lupatsch, I. (2004). “The Effect of Photoperiod and Temperature on the Reproduction of European Sea Urchin *Paracentrotus lividus*.” *Aquaculture* 232(1–4):343–55. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00539-8.
- Shpigel, M., McBride, S. C., Marciano, S., Ron, S., & Ben-Amotz, A. (2005). Improving gonad colour and somatic index in the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 245(1–4), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.043>
- Shpigel, M., Schlosser, S. C., Ben-Amotz, A., Lawrence, A. L., & Lawrence, J. M. (2006). Effects of dietary carotenoid on the gut and the gonad of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 261(4), 1269-1280.
- Shpigel, M., Shauli, L., Odintsov, V., Ben-Ezra, D., Neori, A., & Guttman, L. (2018). The sea urchin, *Paracentrotus lividus*, in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system with fish (*Sparus aurata*) and seaweed (*Ulva lactuca*): Nitrogen partitioning and proportional configurations. *Aquaculture*, 490, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.051>
- Siikavuopio, S. I., Dale, T., Foss, A., & Mortensen, A. (2004). Effects of chronic ammonia exposure on gonad growth and survival in green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 242(1–4), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.042>
- Smith, L. C. (2010). Diversification of innate immune genes: Lessons from the purple sea urchin. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 3(5–6), 274–279. <https://doi.org/10.1242/dmm.004697>
- Smith, L. C., Hawley, T. S., Henson, J. H., Majeske, A. J., Oren, M., & Rosental, B. (2019). Methods for collection, handling, and analysis of sea urchin coelomocytes. In *Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 150). <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.11.009>
- Soudant, P., E. Chu, F. L., & Volety, A. (2013). Host-parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, Perkinsus species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(2), 196–216. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001>
- Spirlet, C., Grosjean, P., & Jangoux, M. (2000). “Optimization of Gonad Growth by Manipulation of Temperature and Photoperiod in Cultivated Sea Urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata).” *Aquaculture* 185(1–2):85–99. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00340-3.
- Stabili, L., Acquaviva, M. I., Cavallo, R. A., Gerardi, C., Narracci, M., & Pagliara, P. (2018). Screening of Three Echinoderm Species as New Opportunity for Drug Discovery: Their Bioactivities and Antimicrobial Properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7891748>
- Stefánsson, G., Kristinsson, H., Ziemer, N., Hannon, C., & James, P. (2017). Markets for sea urchins: A review of global supply and markets. *Skýrsla Mátis*, (October), 45 pp. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12657.99683>
- Sun, J., Chi, X., Yang, M., Ding, J., Shi, D., Yu, Y., Chang, Y., & Zhao, C. (2019). “Light Intensity Regulates Phototaxis, Foraging and Righting Behaviors of the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*.” *PeerJ* 2019(11). doi: 10.7717/peerj.8001.

- Sweet, M., Mark B., & Jane E. W. (2016). "New Disease Outbreak Affects Two Dominant Sea Urchin Species Associated with Australian Temperate Reefs." *Marine Ecology Progress Series* 551:171–83. doi: 10.3354/meps11750.
- Sweet, M. (2020). *Sea Urchin Diseases: Effects from Individuals to Ecosystems*. Vol. 43. 4th ed. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00012-3>.
- Tegner, M. J., & Dayton, P. K. (2000). Ecosystem effects of fishing in kelp forest communities. *ICES Journal of Marine Science*, 57(3), 579–589. <https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0715>
- Xue, Q., Itoh, N., Schey, K. L., Cooper, R., & La Peyre, J. F. (2009). "Evidence Indicating the Existence of a Novel Family of Serine Protease Inhibitors That May Be Involved in Marine Invertebrate Immunity." *Fish and Shellfish Immunology* 27(2):250–59. doi: 10.1016/j.fsi.2009.05.006.
- Walker, C., Unuma, T., & Lesser, M. P. (2007). "Chapter 2 Gametogenesis and Reproduction of Sea Urchins." *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 37:11–33. doi: 10.1016/S0167-9309(07)80066-4.
- Wang, F., Yang, H., Gao, F., & Liu, G. (2008). Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 151(4), 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.024>
- Wardlaw, A. C., & Unkles, S. E. (1978). "Bactericidal Activity of Coelomic Fluid from the Sea Urchin *Echinus esculentus*." *Journal of Invertebrate Pathology* 32(1):25–34. doi: 10.1016/0022-2011(78)90170-2.
- Wei, J., Zhang, L., Zhao, C., Feng, W., Sun, P., & Chang, Y. (2016). "Correlation Analyses of Covering and Righting Behaviors to Fitness Related Traits of the Sea Urchin *Glyptocidaris crenularis* in Different Environmental Conditions." *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 34(6):1183–90. doi: 10.1007/s00343-016-5133-y.
- Yeruham, E., Abelson, A., Rilov, G., Ben Ezra, D., & Shpigel, M. (2018). Energy budget of cultured *Paracentrotus lividus* under different temperatures. *Aquaculture*, 501, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.006>
- Yeruham, E., Rilov, G., Shpigel, M., & Abelson, A. (2015). Collapse of the echinoid *Paracentrotus lividus* populations in the Eastern Mediterranean - Result of climate change? *Scientific Reports*, 5(March), 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep13479>
- Zabel, B. A., Zuniga, L., Ohyama, T., Allen, S. J., Cichy, J., Handel, T. M., & Butcher, E. C. (2006). Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. *Experimental Hematology*, 34(8), 1021–1032. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.05.003>
- Zhang, L., Zhang, L., Shi, D., Wei, J., Chang, Y., & Zhao, C. (2017). "Effects of Long-Term Elevated Temperature on Covering, Sheltering and Righting Behaviors of the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*." *PeerJ* 2017(3):8–20. doi: 10.7717/peerj.3122.
- Zhao, J., Song, L., Li, C., Zou, H., Ni, D., Wang, W., & Xu, W. (2007). Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the

recombinant protein. *Molecular Immunology*, 44(6), 1198–1208. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.06.008>

Zhao, C., Bao, Z., & Chang, Y. (2016). “Fitness-Related Consequences Shed Light on the Mechanisms of Covering and Sheltering Behaviors in the Sea Urchin *Glyptocidaris crenularis*.” *Marine Ecology* 37(5):998–1007. doi: 10.1111/maec.12311.

Zhu, Y. T., Zhang, Y., Liu, Y. Z., Li, Y. F., Yoshida, A., Osatomi, K., Yang, J. L., & Liang, X. (2020). Nitric Oxide Negatively Regulates Larval Metamorphosis in Hard-Shelled Mussel (*Mytilus coruscus*). *Frontiers in Marine Science*, 7(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00356>

Zito, F., Costa, C., Sciarrino, S., Cavalcante, C., Poma, V., & Matranga, V. (2005). Cell adhesion and communication: a lesson from echinoderm embryos for the exploitation of new therapeutic tools. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 39, 7–44. [https://doi.org/10.1007/3-540-27683-1\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-27683-1_2)

Zupo, V., Glaviano, F., Paolucci, M., Ruocco, N., Polese, G., Cosmo, A., Costantini, M., & Mutalipassi, M. (2018). “Roe Enhancement of: Nutritional Effects of Fresh and Formulated Diets.” *Aquaculture Nutrition* 25(1):26–38. doi: 10.1111/anu.12826.

## 7 Anexo I

Tabela A1- Resultados da análise de variância (ANOVA) aos indicadores morfométricos (peso e índice gonadossomático) dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e com ração vegetal durante o ensaio nutricional de 90 dias. F representa o teste da ANOVA e H representa o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; P representa o nível de significância e gl representa os graus de liberdade.

Indicador	Fonte de variação	Análise de variância			
		Teste estatístico	gl	P	Teste post-hoc
Diâmetro	Dieta	F= 0,559	1	0,456	
	Amostragem	F= 2,480	2	0,086	
	Dieta x Amostragem	F= 1,073	2	0,344	
Peso	Dieta	F= 1,586	1	0,209	≠ entre T0 e T2
	Amostragem	F= 4,127	1	0,017	
	Dieta x Amostragem	F= 1,220	2	0,297	
Índice gonadossomático	Macroalga	F= 2,019	2	0,143	
	Ração vegetal	H= 35,886	2	<0,001	≠ entre T0-T1 e T0-T2

Tabela A2- Resultados da análise de variância (ANOVA) e teste independente (T-student) aos resultados dos testes comportamentais realizados após as experiências de exposição aguda dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com duas dietas, macroalga (*Ulva rigida*) e ração vegetal. (°C)- aumento brusco da temperatura; (Al.)- macroalga (*Ulva rigida*); (NH<sub>3</sub>)- concentração elevada de amônia; (Rv.)- ração vegetal. Estatísticas de teste: t representa o teste T-student; F representa o teste da ANOVA; P representa o nível de significância e gl representa os graus de liberdade.

Indicador	Fonte de variação	ANOVA				Teste t entre grupo exposto e controlo		
		Teste estatístico	gl	P	Teste post-hoc	Teste estatístico	gl	P
Testes comportamentais	Fator (°C, Al.)	F= 1,474	1	0,231		t= 1,375	16	0,188
	EEA(°C, Al.)	F= 1,568	2	0,219		t= 1,508	8,639	0,167
	Fator x EEA (°C, Al.)	F= 2,726	2	0,076		t= 1,704	16	0,108
	Fator (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 5,109	1	0,028				
	EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 1,340	2	0,271				
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 0,504	2	0,607				
	Fator (°C, Rv.)	F= 0,161	1	0,690		t= 1,044	16	0,312
	EEA (°C, Rv.)	F= 3,612	2	0,035		t= 4,539	16	< 0,001
	Fator x EEA (°C, Rv.)	F= 3,773	2	0,030		t= 0,768	16	0,454
	Fator (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 9,011	1	0,004	≠ grupo exposto e controlo em T0 e T2			
	EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 4,448	2	0,017				
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 7,009	2	0,002				

Tabela A3- Resultados da análise de variância (ANOVA) e teste independente (T-student) aos parâmetros de imunidade celular (percentagens de células) observados nas experiências de exposição aguda (EEA) realizadas com ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com duas dietas, macroalga (*Ulva rigida*) e ração vegetal durante o ensaio nutricional de 90 dias. (°C)- aumento brusco da temperatura; (Al.)- macroalga (*Ulva rigida*); (NH<sub>3</sub>)- concentração elevada de amônia; (Rv.)- ração vegetal. Estatísticas de teste: t representa o teste T-student, F representa a ANOVA; P representa o nível de significância e gl representa os graus de liberdade.

Indicador	Células imunes	Fonte de variação	ANOVA				Teste t entre grupo exposto e controlo		
			Teste estatístico	gl	P	Teste post-hoc	Teste estatístico	gl	P
Percentagem de células	Fagócitos	Fator (°C, Al.)	F= 1,411	1	0,241		t= 1,538	16	0,144
		EEA (°C, Al.)	F= 0,208	2	0,813		t= 1,635	16	0,121
		Fator x EEA (°C, Al.)	F= 1,160	2	0,052		t= 2,315	16	0,034
		Fator (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 0,389	1	0,536	≠ grupo exposto e controlo em EEA1			
		EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 1,114	2	0,337				
		Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 6,743	2	0,003				
		Fator (°C, Rv.)	F= 0,007	1	0,933				
		EEA (°C, Rv.)	F= 2,046	2	0,140				
		Fator x EEA (°C, Rv.)	F= 1,351	2	0,269				
		Fator (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,267	1	0,608				
		EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,329	2	0,721				
		Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,099	2	0,905				
	Granulócitos incolores	Fator (°C, Al.)	F= 1,922	1	0,172				
		EEA (°C, Al.)	F= 0,652	2	0,526				
		Fator x EEA (°C, Al.)	F= 1,739	2	0,182				
		Fator (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 0,083	1	0,775	≠ grupo exposto e controlo EEA0 e EEA1			
		EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 8,349	2	0,001				
		Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 10,293	2	< 0,001				
		Fator (°C, Rv.)	F= 0,646	1	0,426				
		EEA (°C, Rv.)	F= 1,995	2	0,147				
		Fator x EEA (°C, Rv.)	F= 0,550	2	0,581				
		Fator (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,623	1	0,434				
		EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 2,207	2	0,121				
		Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 1,853	2	0,168				
	Granulócitos vermelhos	Fator (°C, Al.)	F= 0,917	1	0,343				
		EEA (°C, Al.)	F= 1,609	2	0,211				
		Fator x EEA (°C, Al.)	F= 2,417	2	0,100				
		Fator (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 0,228	1	0,635				
		EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 1,239	2	0,299				
		Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 1,342	2	0,271				
Fator (°C, Rv.)		F= 2,928	1	0,094					
EEA (°C, Rv.)		F= 4,552	5	0,015					

Células vibráteis	Fator x EEA (°C, Rv.)	F= 0,340	2	0,714	≠ entre EEA0 e EEA1			
	Fator (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,120	1	0,731				
	EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 1,875	2	0,164				
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,991	2	0,379				
	Fator (°C, Al.)	F= 0,624	1	0,433				
	EEA (°C, Al.)	F= 1,968	2	0,151				
	Fator x EEA (°C, Al.)	F= 0,533	2	0,59				
	Fator (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 2,360	1	0,131				
	EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 1,817	2	0,174				
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 0,951	2	0,394				
	Fator (°C, Rv.)	F= 1,605	1	0,211		t= 1,378	16	0,187
	EEA (°C, Rv.)	F= 3,015	2	0,058		t= 0,079	16	0,938
	Fator x EEA (°C, Rv.)	F= 0,566	2	0,571		t= 1,069	16	0,301
	Fator (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,128	1	0,722	≠ entre EEA0 - EEA2 e EEA1 e EEA2			
	EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 5,387	2	0,008				
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,132	2	0,877				

Tabela A4- Resultados da análise de variância (ANOVA) e teste independente (T-student) ao efeito do momento de amostragem e nível de exposição aguda a temperatura elevada e a concentração elevada de amônia sobre os parâmetros de resposta imune (concentração de lisozima e atividade da protease) no fluido celômico dos ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* alimentados com macroalga (*Ulva rigida*) e ração vegetal num ensaio nutricional de 90 dias. (°C)- aumento brusco da temperatura; (Al.)- macroalga (*Ulva rigida*); (NH<sub>3</sub>)- concentração elevada de amônia; (Rv.)- ração vegetal. Estatísticas de teste: t representa o teste T-student, F representa o teste da ANOVA; P-value representa o nível de significância e gl representa os graus de liberdade.

Indicador	Fonte de variação	ANOVA				Teste t entre grupo exposto e controlo		
		Teste estatístico	gl	P	Teste post-hoc	Teste estatístico	gl	P
Lisozima	Fator (°C, Al.)	F= 8,061	1	0,007		t= 4,502	16	< 0,001
	EEA (°C, Al.)	F= 21,249	2	< 0,001		t= 0,835	10,261	0,423
	Fator x EEA (°C, Al.)	F= 9,897	2	< 0,001		t= 3,455	16	0,003
	Fator (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 14,007	1	< 0,001		t= 3,925	16	0,001
	EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 21,662	2	< 0,001		t= 1,568	9,433	0,15
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 7,576	2	0,001		t= 0,700	16	0,494
	Fator (°C, Rv.)	F= 9,900	1	0,003		t= 6,386	16	< 0,001

	EEA (°C, Rv.)	F= 58,217	2	< 0,001		t= 4,256	16	0,001
	Fator x EEA (°C, Rv.)	F= 40,294	2	< 0,001		t= 1,225	12,385	0,243
	Fator (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,037	1	0,848		t= 0,146	16	0,886
	EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 4,555	2	0,015		t= 0,728	16	0,477
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,092	2	0,912		t= 0,600	16	0,557
Protease	Fator (°C, Al.)	F= 3,729	1	0,059	≠ entre a EEA1 e EEA2			
	EEA (°C, Al.)	F= 5,609	2	0,006				
	Fator x EEA (°C, Al.)	F= 0,654	2	0,525				
	Fator (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 0,015	1	0,904				
	EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 1,081	2	0,348				
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Al.)	F= 0,168	2	0,846				
	Fator (°C, Rv.)	F= 0,801	1	0,375		t= 0,074	16	0,942
	EEA (°C, Rv.)	F= 0,542	2	0,585		t= 0,604	16	0,554
	Fator x EEA (°C, Rv.)	F= 0,848	2	0,434		t= 1,527	13,523	0,150
	Fator (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 0,718	1	0,401		t= 1,176	16	0,257
	EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 4,707	2	0,014		t= 0,605	16	0,553
	Fator x EEA (NH <sub>3</sub> , Rv.)	F= 1,010	2	0,372		t= 0,920	16	0,371