

JOÃO CORTES RAPOSO COUTINHO

**Efeito do parasita dinoflagelado *Amyloodinium*
ocellatum em ostras *Crassostrea gigas* em cultivos
multitróficos**

Orientadoras:

Professora Doutora Ana Maria Duque de Araújo Munhoz

Doutora Florbela Maria Benjamin Soares

Doutora Cátia Andreia Lourenço Marques

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2021

JOÃO CORTES RAPOSO COUTINHO

**Efeito do parasita dinoflagelado *Amyloodinium*
ocellatum em ostras *Crassostrea gigas* em cultivos
multitróficos**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 09 de abril de 2021 com o Despacho de Nomeação de Júri N° 92/2021 com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Joana Araújo Nobre Catita

Arguente: Professora Doutora Ana Patrícia Antunes Lopes

Orientadora: Professora Doutora Ana Araújo Munhoz

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2021

Epígrafe

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”

(Albert Einstein)

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”

(Benjamin Disraeli)

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista”

(Aldo Novak)

“O ego é dotado de um poder, de uma força criativa, conquista tardia da humanidade, a que chamamos vontade”

(Carl Jung)

“A persistência é o caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

“A educação é a descoberta progressiva da nossa ignorância”

Will Durant

“A vida deve ser uma constante educação”

(Gustave Flaubert)

“O sucesso é uma consequência e não um objetivo”

(Gustave Flaubert)

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

Ao meu Pai por ter exigido de mim e me tornar num homem com valores;

À minha mãe por nunca ter desistido de mim e por ser o meu pilar

Aos meus irmãos Diogo e Gonçalo por me terem acompanhado e torcido por mim

Aos meus avós que já partiram, mas que me ensinaram a lutar pelos sonhos com afinco

Aos meus tios e primos que a vida é uma escola que nos ensina todos os dias

Agradecimentos

A dissertação de Mestrado é a tarefa mais solitária, imprevisível, educadora e duradoura que um estudante pode, com muitos percalços pelo caminho, experienciar.

Este trabalho reúne a informação que recolhi no período de estágio, junto de várias pessoas cuja ajuda muito agradeço, pelo apoio e pronta disponibilidade.

Desde logo, agradeço profundamente, à Professora Ana Maria Araújo, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Lisboa, que acreditou em mim aceitando-me como seu orientando. Impõe-se referir a sua total disponibilidade desde o primeiro momento, colocando ao meu dispor material, informação e ajuda. Mas o maior incentivo foi a sua forma direta, corajosa e amigável de me apoiar, sobretudo quando vacilei sobre a minha capacidade para prosseguir o estudo desta matéria que pela sua conhecida atualidade e interesse, veio a revelar-se tema de enorme importância científica no universo da aquacultura.

À Professora. Doutora Florbela Soares, pelos esclarecimentos e estudos, sempre de forma gentil, dedicada e recetiva como me ajudou na realização das tarefas diárias no IPMA e que me ajudaram a conhecer melhor o mundo da aquacultura e a compreender sua dimensão. A sua presença foi vital e reconfortante em múltiplos aspetos.

À Professora Doutora Cátia Marques que aceitou ser minha co-orientadora pela prontidão sempre demonstrada, pelos preciosos conselhos, pelos testemunhos na primeira pessoa São poucas as palavras para agradecer a sua sempre agradável forma de me incentivar, sugerindo atos e métodos nas tarefas que me foram indicadas.

Ao Mestre Márcio Moreira pelo cuidado, disponibilidade e recetividade sempre demonstradas, sem o seu apoio esta experiência não teria sido tão agradável e interessante.

Aos projetos de investigação SAUDE&AQUA (MAR-02.05.01-FEAMP-0009), Be4AQUAHEALTH (MAR-02.05.01-FEAMP-0013) e DIVERSIAQUA II (MAR2020-P02M01-0656P) pelo financiamento.

Aos meus pais, à minha mãe, por todo o apoio, por genuinamente me acompanhar e instigar nas situações importantes da minha vida, pela compreensão e afeto, sem ela nada teria sido possível. Ao meu pai, pelos importantes conselhos e apoio.

Aos meus irmãos, pelo companheirismo, sugestões, paciência e por aturarem os meus disparates

Ao Reinaldo Martins que me ajudou com ideias, estratégias e bom humor a ultrapassar os meus obstáculos.

Aos meus amigos pelo apoio e amizade, entre eles João Roque que quis ajudar como pôde para que esta tese se concretizasse; Sílvia Moreira, que me acompanhou neste curso e partilhou comigo sucessos e insucessos e que sempre me apoiou, à Vanda Pereira por ter sido a primeira pessoa que conheci neste curso e me ter visto crescer desde o início e ajudado no que podia, à Catarina Ramos pelo seu espírito doce e lutador a servir-me de exemplo, à Sara Barbosa Soeiro pelo bom humor e bons momentos e à Cátia Lopes pela sua amizade honesta e preocupação.

E um especial às minhas colegas e amigas Sara Cardoso, Marta Alves, Mafalda Santos, Joana Ripado, Carolina Dias, Carolina Soares e Beatriz Mascarenhas por acreditarem na minha teimosia, um sincero obrigado.

E a todos aqueles que me deram, direta ou indiretamente, o seu auxílio na realização deste trabalho.

Resumo

A aquacultura é hoje uma atividade muito praticada e com previsões de expansão, de modo a acompanhar o crescimento da população humana e a consequente necessidade de produção de alimentos. Uma das grandes ameaças, capaz de causar perdas enormes em explorações, particularmente, em produções semi-intensivas e intensivas de peixes marinhos e que exige medidas atempadas, é a ocorrência de parasitas, tais como o dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum*, em peixes. Sendo a ostra um organismo filtrador, muitas vezes co-produzida com os peixes, em cultivos multitróficos, surge o interesse de verificar o efeito deste organismo, nomeadamente da espécie *Crassostrea gigas*, comum na costa portuguesa. Neste trabalho, as ostras foram expostas ao parasita *A. ocellatum* e os efeitos desta exposição foram observados através da utilização de 2 metodologias (histologia e biologia molecular) e ainda identificado por sedimentação de fezes. As hipóteses colocadas antes da realização deste estudo foram (1) as ostras (*C. gigas*) poderem funcionar como elemento mitigador da infeção com *A. ocellatum*, funcionando como possível alternativa para combater a amiloodiniose e (2) as ostras funcionarem como vetor disseminador da infeção provocada pelo parasita *A. ocellatum*. Este trabalho consistiu na (1) realização de um ensaio experimental com vista à determinação dos efeitos da incidência parasitária de *A. ocellatum* na ostra, e (2) impacto da presença de ostras na capacidade infetante do parasita. Segundo os exames de sedimento de fezes, análises histológicas e de biologia molecular, o parasita aparenta ter provocado lesões nas branquias e trato digestivo da ostra, embora sem que cause, obrigatoriamente a sua morte. Posteriormente, é libertado nas fezes, revelando capacidade locomotiva, o que nos levou a acreditar que preservou o sentido de busca por um hospedeiro, utilizando a ostra como reservatório e vetor em caso de transporte de ostras infetadas com *A. ocellatum* para outras explorações aquícolas. Este resultado pode revelar-se importante na medida em que a ostra ao conter e transportar *A. ocellatum* no seu interior, liberta-o em tanques/explorações diferentes causando surtos em zonas indemnes e consequentemente perdas económicas elevadas.

Palavras-chave: Aquacultura; *Amyloodinium ocellatum*; *Crassostrea gigas*; cultivos multitróficos; parasita; patologia.

Abstract

Aquaculture is nowadays a widely practiced activity and with projected growth, in order to keep up with the increase of the human population and the consequent need for food production. One of the major threats that can cause huge losses on fish farms, particularly in semi-intensive and intensive marine fish farms, when not prevented, is parasitisation by *Amyloodinium ocellatum* in fishes. As the oyster is a filtering organism, often co-produced with fish, in multitrophic cultures, there is interest in verifying the effect of this organism, namely the specie *Crassostrea gigas*, common on the Portuguese coast. In this work, oysters were exposed to the parasite *A. ocellatum* and the effects of this exposure were observed through the use of 2 methodologies (histology and molecular biology) and further identified by fecal sedimentation. The hypotheses proposed before conducting this study were (1) oysters may act as a mitigating factor for *A. ocellatum* infection, functioning as a possible alternative to prevent amyloodiniosis and (2) oysters function as a vector for the spread of infection caused by parasite *A. ocellatum*. This work consisted of (1) carrying out an experimental test to determine the effects of the parasitic incidence of *A. ocellatum* on the oyster, and (2) evaluating the impact of the presence of oysters on the parasite's infective capacity. According to oyster feces sediment, histological and molecular biology methodologies, the parasite appears to have caused damage to the gills and digestive tract of the oyster, although without necessarily causing its death. It is subsequently released from feces, revealing locomotive capacity, which led us to believe that it preserved the sense of searching for a host, using the oyster as a reservoir and vector in the case of transport of oysters infected with *A. ocellatum* to other aquaculture farms. This result can prove to be important as the oyster, when containing and transporting *A. ocellatum* inside, releases it in different tanks/farms causing outbreaks in free areas and consequently high economic losses.

Keywords: Aquaculture; *Amyloodinium ocellatum*; *Crassostrea gigas*; multitrophic farming; parasite; pathology.

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AND/DNA – Ácido desoxirribonucleico / deoxyribonucleic acid

ANOVA – **A**nalise **o**f **V**ariance / Análise da Variância

EPPO - Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations / Organização dos Estados Unidos da América da Comida e Agricultura

g – Grama (medida de peso)

H/h – Hora(s)

HAB - Harmful Algal Bloom

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

mM – MiliMol (medida de quantidade)

NCCD – International Nomenclature Committee on Cell Death/ Comitê de Nomenclatura Internacional para Morte Celular

O₃ - Ozono

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PLTX – Palitoxina (toxina marinha de natureza polietérea e polihidroxilada)

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

UV – Ultravioleta

Valor de F/distribuição de estatística F – Variável de Fisher-Snedecor.

& - And (e)

% - Por cento (Porcentagem)

°C – Graus Celsius (medida de temperatura)

2ⁿ - Dois Elevado a n (variável de número inteiro e positivo)

± - plus-minus (utilizado para definir um intervalo de valores)

Índice Geral

	Páginas
Epígrafe	3
Dedicatória	4
Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract	8
Abreviaturas, Siglas e Símbolos	9
Índice de Tabelas	12
Índice de Gráficos	13
Índice de Figuras	14
Capítulo I	15
Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio no IPMA	15
Capítulo II - Dissertação	19
1 Introdução	19
1.1 Importância da aquicultura	19
1.2 <i>Crassostrea gigas</i>	22
1.3 Patologias que afetam os organismos marinhos de aquicultura	28
1.4 <i>Amyloodinium ocellatum</i>	30
1.4.1 Ciclo de vida do parasita, tolerância a salinidade e temperatura e modo de transmissão	34
1.4.2 Sensibilidade dos peixes à amiloodiniose	38
1.4.3 Sinais clínicos e lesões macroscópicas e microscópicas	40
1.4.4 Diagnóstico, medidas profiláticas e tratamentos	43
1.4.4.1 Diagnóstico	43
1.4.4.2 Medidas profiláticas	45
1.4.4.3 Tratamento	49
2 Objetivos	55
3 Material e Métodos	57
3.1 Local de estudo	57
3.2 Material biológico	57
3.3 Desenho experimental	58
3.4 Procedimento	58

3.5 Análises laboratoriais.....	61
3.5.1 Histologia.....	61
3.5.2 Biologia Molecular	63
3.5.3 Viabilidade dos dinósporos após filtração pelas ostras.....	65
3.6 Análise estatística	68
4 Resultados	69
4.1 Dados biológicos	69
4.2 Parâmetros de qualidade da água.....	69
4.3- Observação da filtração das ostras <i>Crassostrea gigas</i> em ambos os tratamentos	69
4.4 Análise histológica.....	72
4.4.1 Avaliação do lúmen tubular do trato intestinal das ostras (<i>Crassostrea gigas</i>).....	72
4.4.2 Identificação e classificação das lesões nas brânquias e trato digestivo das ostras	75
4.5 Resultados de biologia molecular	78
4.6 Viabilidade dos dinósporos após filtração pelas ostras.....	78
4.7 Fase de recuperação	80
5 Discussão de Resultados.....	81
5.1 Dados biológicos	81
5.2 Parâmetros de qualidade da água.....	81
5.3 Observação da filtração das ostras.....	82
5.4 Histologia.....	82
5.4.1 Avaliação do lúmen tubular do trato digestivo das ostras – Avaliação biométrica	83
5.4.2 Identificação e classificação das lesões nas brânquias e trato digestivo das ostras – Avaliação celular	84
5.5 Biologia molecular.....	87
5.6 Viabilidade dos dinósporos.....	88
5.7 Outras observações	89
6. Conclusões	90
7. Referências bibliográficas.....	93
8. Apêndices e anexos	110

Índice de Tabelas

Tabela I. Reagentes adicionados aos tubos de PCR.	64
Tabela II. Valores dos parâmetros físico-químicos registrados durante o ensaio experimental.....	69
Tabela III. Média e desvio padrão dos valores da área, perímetro e circularidade do lumen tubular das ostras (<i>Crassostrea gigas</i>) utilizadas no ensaio de cada tempo.	74

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Valores médios da área do lúmen do trato digestivo da ostra (<i>C. gigas</i>).....	73
Gráfico 2. Valores médios do perímetro do lúmen do trato digestivo da ostra (<i>C. gigas</i>)	73
Gráfico 3. Valores médios da circularidade do lúmen do trato digestivo da ostra (<i>C. gigas</i>)	74
Gráfico 4. Média das contagens de dinósporo de <i>Amyloodinium ocellatum</i> nos poços de cultura.....	79

Índice de Figuras

Figura 1. Fluxograma do desenho experimental	17
Figura 2. Esquema de um molusco bivalve.....	22
Figura 3. Taxonomia da ostra <i>Crassostrea gigas</i>	23
Figura 4. Diagrama exemplificativo das várias condições necessárias à ocorrência de doença.	28
Figura 5. Fotografia de dinósporo de <i>Amyloodinium ocellatum</i> em microscópio.....	30
Figura 6. Taxonomia do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i>	31
Figura 7. Micrografia de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) infestada de <i>Amyloodinium ocellatum</i> , na sua fase adulta (trofonte).....	32
Figura 8. Imagem microscópica de trofontes e tomontes de <i>Amyloodinium ocellatum</i> em brânquias de corvinas (<i>Argyrosomus regius</i>).....	33
Figura 9. Ciclo Biológico de <i>Amyloodinium ocellatum</i>	34
Figura 10. Esquema do parasita <i>Amyloodinium ocellatum</i> na sua fase adulta (trofonte).	35
Figura 11. Fotografia aérea da localização da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO)/ Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA)	58
Figura 12. Fotografia aérea dos tanques de terra de onde foram recolhidas as ostras utilizadas neste estudo da EPPO/ IPMA.....	59
Figura 13. Fluxograma do ensaio experimental – As etapas das ostras <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do ensaio.....	60
Figura 14. Comprimento máximo registado para a biometria das ostras (<i>Crassostrea gigas</i>).....	61
Figura 15. Fotografia utilizada no programa Imagej para obtenção da área, perímetro e circularidade do lúmen do intestino da ostra <i>Crassostrea gigas</i>	62
Figura 16. Esquema exemplificativo dos ciclos do PCR.....	64
Figura 17. Fluxograma simplificado das várias etapas realizadas num PCR: desnaturação, annealing e extensão.....	65
Figura 18. Imagem padrão de fragmentos de marcador.	65
Figura 19. Esquema da organização das amostras de sedimentação de fezes no suporte de poços de cultura.. ..	67
Figura 20. Fotografias demonstrativas da evolução da cor do tanque do grupo controlo e infetado após adição do alimento T4 e T8.	70
Figura 21. Fotografia comparativa de ambos os tanques no ponto T8.....	71
Figura 22. Fotografia comparativa de ambos os tanques no ponto T48.....	71
Figura 23. Transformação das imagens para o uso de <i>imagej</i> para avaliação da área, do perímetro e circularidade do lúmen do trato digestivo das ostras.....	72
Figura 24. Observações histopatológicas em T0 do estômago da ostra (<i>Crassostrea gigas</i>) no grupo controlo.....	75
Figura 25. Observações histopatológicas em T0 dos filamentos branquiais da ostra <i>Crassostrea gigas</i> em controlo.....	76
Figura 26. Fotografia dos túbulos intestinais da ostra <i>Crassostrea gigas</i> após 24 horas de contaminação com <i>Amyloodinium ocellatum</i> observados no digitalizador.....	76
Figura 27. Resultados das amostras de ADN genómico submetidas a PCR e corridas em eletroforese de gel de agarose.....	78
Figura 28. Amostras de Fezes da ostra (<i>Crassostrea gigas</i>), após ensaio.	79

Capítulo I

Descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio no IPMA

O Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) é um instituto público integrado na administração direta do Estado Português, que concentra os seus esforços de investigação em projetos que revertam para aplicações diretas com utilização na atividade operacional, na procura de uma melhoria da informação disponibilizada aos seus utilizadores, quer esta se reflita em atividades de carácter comercial, quer se dirija a sectores de serviço público e em particular, neste caso, com a preocupação orientada para a salvaguarda da segurança de pessoas e bens. O IPMA assume as suas responsabilidades a nível do território nacional, nos domínios do mar e da atmosfera e procura renovar e melhorar, assim como obter/informar mais e melhor, todos os interessados. O IPMA possui polos por todo o território português e é dotado de autonomia administrativa e financeira e património próprio.

Foi no âmbito do estágio curricular, com a autorização do Doutor Pedro Pousão-Ferreira investigador responsável pela Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), que frequentei as instalações da EPPO-IPMA de 1 de outubro de 2018 a 18 abril de 2019. Durante este período, foram realizadas atividades diversas direcionadas à manutenção e normas de rotina, necessárias ao normal funcionamento da estação e para a realização das diversas experiências que decorrem na mesma. No início foram-me apresentadas as diversas instalações da casa, assim como as normas funcionais que regulam as diversas atividades e asseguram o seu regular exercício.

A maior parte do tempo deste estágio foi dedicado à experiência sugerida pelo IPMA que aceitei com entusiasmo. Dediquei esta tese à investigação proposta, para que se aprofundasse o conhecimento sobre o parasita *Amyloodinium ocellatum*, em virtude da sua grande importância e interesse atuais na área da aquacultura. Durante este período também se realizaram várias formações nas instalações do IPMA, nas quais participei e que contribuíram para o meu enriquecimento de conhecimentos.

A experiência consistiu em estudar se o parasita *A. ocellatum*, identificado atualmente como um grande problema para explorações de peixes marinhos, sobrevivia após filtração pela ostra e se esta era afetada a nível do seu intestino, e uma vez afetada se tinha a capacidade de recuperar após esse contacto. Para tal realizou-se um ensaio com 2 tanques (75 L cada) em que num deles foram colocadas 40 ostras *Crassostrea gigas* com água mantida a $21 \pm 0,8$ °C, assim

como oxigenação constante e alimento (2,5 L de microalga *Skeletonema costatum* e 2,5 L de microalga *Phaeodactylum tricornutum*) (grupo controlo) e o outro tanque que possuía as mesmas condições, o mesmo número de ostras (*C. gigas*) e com a adição de 1000 dinósporos/ml³ diariamente durante 3 dias do parasita *A. ocellatum* [grupo de ostras infetadas com o parasita].

Como demonstrado no fluxograma (Fig. 1), a experiência iniciou-se com uma preparação das condições para que esta decorresse sob condições controladas e de maneira a que o número de variáveis entre ambos os tanques fosse mínimo, de modo a minimizar possíveis influências nos resultados. Entre eles, a alimentação, a temperatura desejada, a mesma oxigenação, fonte de água, o material do tanque e localização, obtendo, assim, as mesmas condições. Foram recolhidas 80 ostras (*C. gigas*) de um tanque de terra 750 m³ da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), as quais foram medidas e pesadas de modo a obter uma população o mais uniforme possível para ambos os tratamentos. A mesma quantidade de ostras foi colocada nos tanques e o período de aclimação aos novos tanques decorreu durante 24 horas.

Foram introduzidos no tanque infetado dinósporos (estágio móvel e infecioso do parasita) até atingirmos a concentração de 1000/ml³, diariamente, durante 3 dias (T0-T72). A concentração dos dinósporos foi avaliada diariamente e adequada à concentração desejada camara de Bürker). Foram recolhidas 3 ostras no tempo T0 para avaliação histológica. De seguida realizaram-se recolhas (sempre de 3 ostras do tanque controlo e infetados com exceção do início do ensaio onde se recolheu somente do tanque de controlo) após duas horas (T2), quatro horas (T4), oito horas (T8), vinte e quatro horas (T24), quarenta e oito horas (T48) e ao fim de cinco dias depois (T5D) do início da experiência.

Decorrida esta fase, as ostras foram transportadas novamente para o tanque de terra, onde ficaram em sacos separados [num saco as ostras do controlo, no outro as que estiveram em contacto com o parasita], sendo avaliadas duas vezes por semana. Foram recolhidas novamente 3 ostras controlo e 3 ostras infetadas nos tempos M1 (um mês após o início da experiência) e M2 (dois meses após o início da experiência). Das amostras recolhidas foram efetuadas análises histológicas e moleculares.

Ao longo do ensaio experimental em que as ostras mantiveram o contacto com o parasita *A. ocellatum* realizou-se a recolha de amostras. Foram recolhidas 3 ostras de cada um dos tanques ao longo do ensaio para observações histológicas, com a exceção do início, onde foram recolhidas 3 ostras somente do tanque de controlo e de uma recolha excecional (em T72) que se destinou a

avaliação molecular. Perto do fim do ensaio (T120 - cinco dias) procedeu-se à recolha das fezes para observação de dinósporos que tivessem passado pelo trato digestivo. Após a experiência as ostras restantes foram mantidas num tanque de terra da EPPO-IPMA, onde se mantiveram com o objetivo de se observar se sobreviviam e recuperavam num após contacto com o parasita.

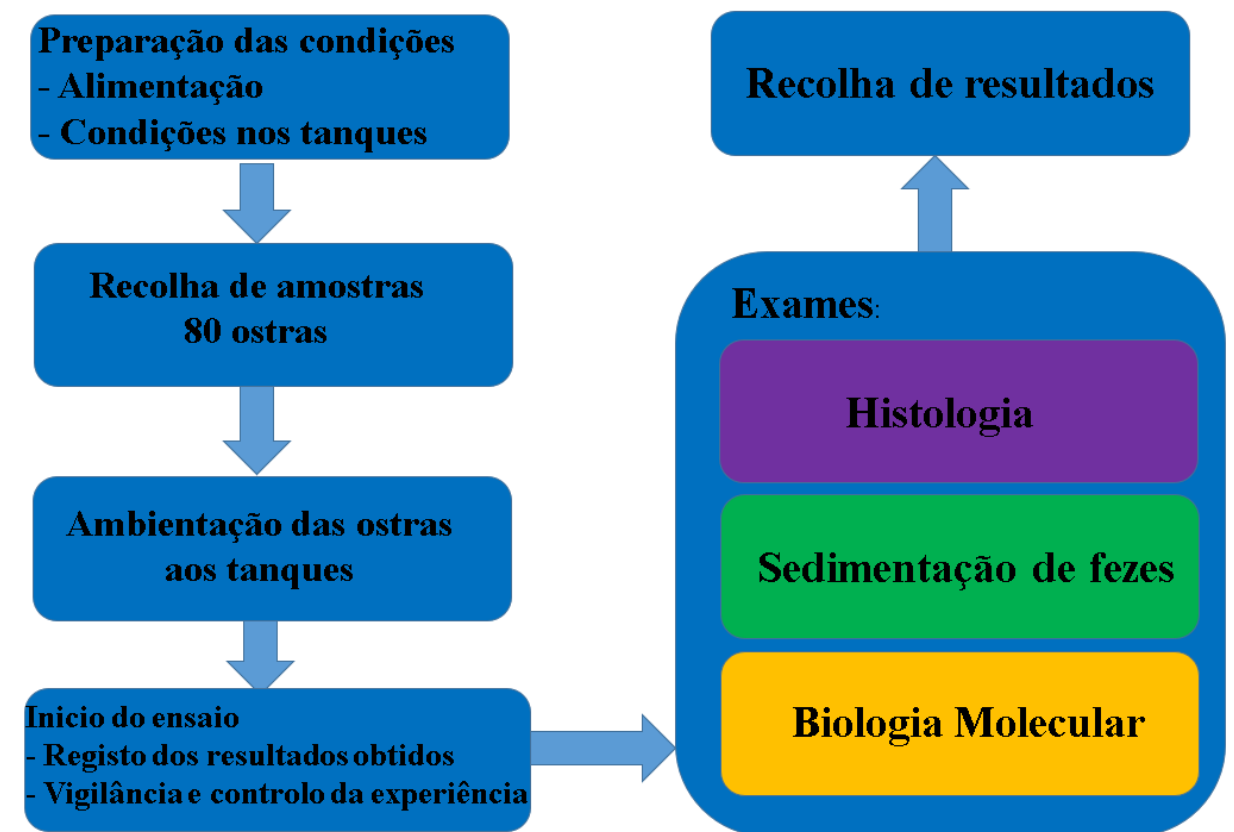


Figura 1. Fluxograma do desenho experimental

As formações assistidas foram:

- **Aumento da qualidade dos produtos de aquacultura: Uma aposta no bem-estar animal**, realizada dia 18 de dezembro de 2018, no âmbito do projeto AQUATRANSFER. Teve a duração de 3,5 horas
- **Meio Ambiente e Aspetos Sociais e de Regulamentação do IMTA** realizada dia 17 de janeiro de 2019, no âmbito do projeto INTEGRATE. Teve a duração de 8 horas
- **Potencial da aplicação de ferramentas bioquímicas e moleculares na investigação em aquacultura: identificação bacteriana** realizada entre 28 de fevereiro e 1 de março de 2019, no âmbito do projeto AQUATRANSFER. Teve a duração de 16 horas
- **Acondicionamento e transporte de animais marinhos vivos**, realizada no dia 27 de março de 2019 no âmbito do projeto AQUATRANSFER. Teve duração de 4 horas

Capítulo II - Dissertação

1 Introdução

1.1 Importância da aquacultura

A aquacultura trata-se da produção de animais aquáticos em espaço fechado e manipulado pela mão do homem. Não se conhece a data da origem desta prática, mas está associada às mudanças de hábitos e costumes do homem nômada quando este se sedentarizou. Porém, só nestes últimos 50 anos é que a importância socioeconômica desta prática passou a ter uma grande projeção. Embora não se saiba a data e local exatos, acredita-se que haverá cerca de 4000 anos que as primeiras aquaculturas terão surgido na China e/ou no Egito, sendo possível produzir peixes, algas, ostras e outros organismos. Na China, o primeiro organismo a ser descrito foi um peixe batizado com o nome de Carpa (*Cyprinus carpio*) que passou a representar um símbolo de boa sorte e fortuna. Já nessa altura era considerado uma fonte alimentar acessível e nutritiva. Milhares de anos mais tarde, a aquacultura, veio a ser reproduzida pelos Romanos que a trouxeram para a Europa estabelecendo os primeiros viveiros de peixe e ostras. Nos anos 60, em Londres (1965) por Fred Hickling, a aquacultura sofre várias alterações com vista a melhorá-la e torná-la mais rentável e interessante, dando assim origem à primeira exploração de piscicultura. Nos dias de hoje a aquacultura é realizada por todo o mundo, representando uma fonte de alimento de extremo interesse e como uma possível solução para combater a fome no mundo (Nash, 2011; Tavares, 2017).

Perante o crescimento mundial da população e consequente aumento da exploração dos recursos marinhos, transformando-os num produto de acesso restrito e reservado a determinadas elites, surge a necessidade de procurar alternativas viáveis para debelar esta falha no provimento de proteína animal, suavizando a carência mundial, permitindo o seu acesso à maioria da população. É neste âmbito que a aquacultura disputa uma importância decisiva, arrogando-se um meio complementar para solucionar escassas fontes de proteína de origem marinha (Chagas, 2016), assim como a aquacultura de moluscos contribui com um mínimo de emissões de dióxido de carbono o que aumenta o seu valor como uma importante fonte de proteína animal com menor pegada de carbono e com potencial relevante para a mitigação da libertação de carbono para a atmosfera (FAO, 2016; Policarpo, 2017).

Em 2018, produção mundial de peixes de aquacultura atingiu 82,1 milhões de toneladas, 32,4 milhões de toneladas de algas aquáticas e 26 000 toneladas de conchas ornamentais e pérolas, trazendo o total para um recorde histórico de 114,5 milhões de toneladas. Em 2018, a produção de peixes de aquacultura foi dominada por peixes (54,3 milhões de toneladas - 47 milhões de toneladas de aquacultura interior e 7,3 milhões de toneladas da aquacultura marinha e costeira), moluscos, principalmente bivalves (17,7 milhões de toneladas) e crustáceos (9,4 milhões de toneladas) (FAO, 2020).

A ostra europeia *Ostrea edulis*, nativa da Europa, faz parte da dieta humana há muitos séculos. Os romanos construíram lagos para recolher e selecionar ostras. No século XVII, as sementes de ostra eram recolhidas em rochas, separadas umas das outras e colocadas em lagoas em pântanos salgados da costa atlântica da França. O declínio da atividade nos pântanos salgados facilitou o desenvolvimento da cultura de ostras ao expandir a atividade para outras áreas de cultivo. Durante os séculos XVIII e XIX, o esforço de pesca levou à sobre-exploração, ao fracasso na recolha e à destruição dos bancos naturais europeus, também afetados por invernos extremamente frios. A escassez no fornecimento de sementes levou os produtores a desenvolver práticas de cultivo destinadas a sustentar um programa de reabastecimento e replantação.

Já no século XX, na Europa, surgiu uma nova prática de manter ostras juvenis em tanques internos até atingirem o tamanho comercializável alimentando-as com microalgas de espécies selecionadas produzidas artificialmente em lagoas ao ar livre.

No que diz respeito às doenças, a mortalidade maciça afetou extensivamente as populações de ostras europeias em 1920. A população recuperou mais tarde, mas foi substituída por ostras em várias áreas de cultivo tradicional. Mais tarde, duas doenças (causadas por *Marteilia refringens* e *Bonamia ostreae*) espalharam-se no início dos anos 1970 e 1980, reduzindo drasticamente a produção de *O. edulis* em quase todas as áreas de cultivo tradicionais da Europa. Apesar das novas práticas de manejo e dos programas intensivos de repovoamento, a produção de *O. edulis* permaneceu baixa desde então (Comps et al., 1976; Boudry et al., 1998).

Em Portugal são cultivadas essencialmente duas espécies de ostra: *Crassostrea gigas* (ostra-do-Pacífico) e *Crassostrea angulata* (ostra-portuguesa), porém tem-se intensificado a produção de *Ostrea edulis* (ostra-europeia), nomeadamente no estuário do rio Sado.

Crassostrea angulata é uma espécie autóctone, por este motivo chamada de ostra-portuguesa, enquanto a ostra-do-Pacífico *C. gigas*, foi introduzida na Europa na década de 1970.

A ostra-portuguesa começou por constituir a base da produção ostreícola na Europa, atingindo-se as 100 000 toneladas por ano (Batista et al., 2008), tendo a contribuição de Portugal chegado a atingir as 9000 toneladas com a produção de ostra nas regiões do Algarve, Sado e Tejo. Porém, uma má gestão, juntamente com uma diminuição da qualidade da água, expôs estes organismos a uma série de patologias que quase levaram à extinção desta espécie (Comps et al., 1976; Boudry et al., 1998).

Face ao declínio das espécies autóctones, a ostra-do-Pacífico (*C. gigas*) foi introduzida na Europa, vinda do Japão, por apresentar boas características para cultivo: maior resistência a patologias, rápido crescimento, elevada capacidade de competição por habitat e baixas taxas de mortalidade (Riesco et al., 2017). No entanto a produção continuada da ostra-do-Pacífico pode colocar em risco a biodiversidade e o crescimento das espécies indígenas (Herbert et al., 2016).

Os moluscos bivalves marinhos podem ser afetados por muitos agentes patogénicos que podem causar doenças e contribuir para diminuir as populações naturais e principalmente cultivada (Bower et al., 1994). Informações sobre agentes patogénicos e seus efeitos sobre as ostras e mexilhões vêm sendo acumuladas nos últimos 30 anos. Segundo Villalba (2002), entre as doenças que afetam os moluscos bivalves marinhos no mundo, provocando perdas importantes, estão as causadas por parasitas.

1.2 *Crassostrea gigas*

Os moluscos constituem o segundo maior filo do reino animal, com os bivalves representando a classe com maior diversidade, distribuição e habitat. São um recurso económico importante, internacionalmente significativo e apresentam características que os tornam organismos sentinela fáceis de usar para avaliação de toxicidade ambiental, assim como de algumas infeções locais presentes (Carella, *et al.*, 2015a). Os bivalves, no geral, possuem um papel fundamental no ecossistema e são muito utilizados em explorações de aquacultura como filtradores naturais dos tanques controlando a biomassa presente, sendo complementares aos filtros artificiais, assim como sentinelas das condições dentro do tanque ou no meio ambiente. São também muito requisitados para investigações ecotoxicológicas (Carella, *et al.*, 2015b).

O termo molusco bivalve designa o animal de corpo mole protegido por um exosqueleto em forma de uma concha de duas valvas, que se articulam por uma charneira e são mantidas unidas pelos músculos adutores (Fig.2). O corpo é constituído essencialmente por um pé e uma série de lâminas branquiais. As valvas são fechadas por retração dos músculos adutores, quando estes relaxam a concha abre automaticamente devido a um ligamento elástico. Os bivalves para respirarem e obterem alimento filtram grandes quantidades de água que entra na cavidade paleal e banha as brânquias onde ficam retidos o fitoplâncton, outros microrganismos e as partículas orgânicas que se encontram em suspensão. (Silva *et al.*, 2008, Policarpo, 2017).

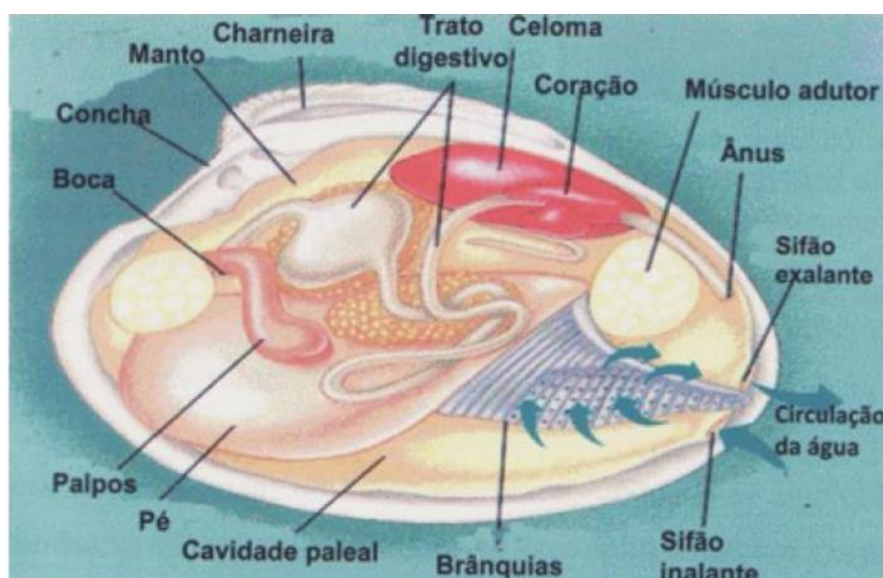


Figura 2. Esquema de um molusco bivalve. Fonte: Silva, Costa & Rodrigues, 2008

Os bivalves são hospedeiros de inúmeros parasitas e outros patogénicos. Em alguns casos, a resposta do hospedeiro passa despercebida e o mesmo não sofre distúrbios no seu desempenho fisiológico. No entanto, existem agentes patogénicos com capacidade de provocar lesões no hospedeiro, podendo resultar na morte do mesmo em grande escala (Carella, *et al.* 2015a). Do ponto de vista histórico, a ostra Portuguesa - *Crassostrea angulata* -, teve uma grande importância comercial na Europa durante todo o século XX até á década de 70, altura em que praticamente desapareceu devido a elevadas mortalidades, causadas por um iridovírus (Família *Iridoviridae*) causador da necrose das brânquias (conhecido por doença das brânquias). Para atenuar essa crise foi introduzida na Europa a ostra *Crassostrea gigas* (Fig. 3), de modo a substituir a ostra portuguesa, que não apresentava uma tão severa mortalidade associada a esse mesmo vírus.



Figura 3. Taxonomia da ostra *Crassostrea gigas* adaptado do 12º Congresso do Algarve - Crescimento e qualidade da ostra *Crassostrea gigas* sujeita a diferentes condições de cultivo em viveiros da Ria Formosa

De entre as ostras, a espécie com maior produção global destaca-se a ostra *Crassostrea gigas* (comumente conhecida por ostra japonesa ou ostra do pacífico) atingindo em 2010 uma produção de 662.513 toneladas. A espécie *Crassostrea gigas*, tem origem natural no leste da Ásia, essencialmente na China e Coreia, sendo também uma espécie endémica no Japão. Contudo, devido à sua introdução em diversos países, essencialmente para produção em aquacultura, a espécie *C. gigas* apresenta hoje uma distribuição geográfica global. Pode ser encontrada da América do Norte à América do Sul, em países como os Estados Unidos da América, Canadá, Brasil, Chile e Argentina. Na Europa encontra-se desde a Noruega a Portugal e ainda em alguns países mediterrânicos (FAO, 2012). Em Portugal são cultivadas

essencialmente duas espécies de ostra: *Crassostrea gigas* (ostra-do-Pacífico) e *Crassostrea angulata* (ostra-portuguesa), porém tem-se intensificado a produção de *Ostrea edulis* (ostra-europeia), nomeadamente no estuário do rio Sado.

Quando se alimentam, as ostras mantêm as valvas entreabertas e forçam a passagem de grandes quantidades de água pelas brânquias. Este método de alimentação permite absorver os nutrientes e eliminar, na forma de pseudofeces as partículas de maior dimensão ou sem interesse para a nutrição. Em condições ambientais ótimas as ostras do género *Crassostrea* podem atingir o tamanho adulto (60-100 g) entre 12 e 30 meses (Gaspar & Pires, 2017).

A ostra *C. gigas* é capaz de filtrar o parasita *A. ocellatum* mas com isto perder faculdades por lesões físicas (Souza, 2014). Existe pouca informação disponível sobre este bivalve em particular mas os invertebrados em geral, ao contrário dos vertebrados, possuem apenas uma imunidade inata natural como mecanismo de proteção. Este mecanismo é extremamente eficiente contra infeções, podendo este, após prévia exposição a um agente, desenvolver imunidade, que pode ser transmitida à descendência, evidenciando aqui alguma capacidade de memória imunológica. Na maioria dos casos, a resposta do bivalve a um agente infeccioso é mediada por células via hemócitos. Estas células possuem algumas funções fisiológicas e imunológicas como a digestão e transporte de nutrientes e capacidade fagocítica. O processo de fagocitose envolve a atração de agentes patogénicos por meio de quimiotaxia, fixação, endocitose e degradação (Carella, *et al.*, 2015a).

Na sua anatomia, são animais de corpo mole lateralmente comprimidos e compostos de duas válvulas articuladas e um potente músculo adutor (Eble & Scro, 1996). O pé está atrofiado e no animal encontra-se no lado esquerdo (válvula à esquerda) (Duarte, 2012). A forma e cor da concha da ostra portuguesa podem ser um pouco variáveis, devido ao tipo de substrato no qual está inserida. As ostras que crescem em substratos moles têm geralmente, menos lâminas que aquelas que se desenvolvem em substratos duros. O seu interior é branco com uma mancha escura perto da ligação do músculo adutor (Duarte, 2012). O corpo é coberto por um tegumento designado de manto, que está também envolvido no processo de calcificação da concha. Entre os dois lados encontra-se a cavidade palial, um espaço livre dividido pelas brânquias, onde existe a circulação da água através de um processo inalante e exalante (não existe sifão), do qual se obtém o processo de respiração e alimentação. A boca está situada perto do umbo, e o ânus encontra-se próximo do músculo adutor. Durante a fase de reprodução, as gónadas ocupam quase toda a totalidade do corpo do animal (Bacca, 2007; Duarte, 2012).

Do ponto de vista evolutivo, a inflamação é um fenómeno altamente conservado a nível morfológico e molecular e constitui a primeira linha de defesa para invertebrados e vertebrados (De Vico, & Carella, 2012; Carella, *et al.*, 2015b).

Quando as linhas de defesa são ultrapassadas, temos a lesão causada pela doença, que se caracteriza por alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais das células, seja esta hereditária, infecciosa, química ou física. As alterações regressivas incluem a morte celular, atrofia e degeneração, resultando numa função celular inferior à normal (Carella, *et al.*, 2015a).

Em alguns exemplos de ensaios experimentais com bivalves realizados com o objetivo de observar e avaliar as lesões, especialmente no trato digestivo e branquia, onde se realizou uma análise em mexilhões com o parasita dinoflagelado *Ostreopsis*. *Cf. Ovata* no Golfo de Nápoles (Itália) (Carella, *et al.* 2015b). Neste estudo observou-se os danos causados no epitélio digestivo, no qual os mexilhões desenvolveram lesões, nomeadamente modificações no lúmen após o contacto com o parasita. Vários outros autores entre os quais Usheva, *et al.* (2006) também realizaram análises e observaram várias lesões histológicas digestivas distintas, tais como degeneração (ex: vacuolização, atrofia, lipofuscinose), destruição (como por exemplo, redução de altura da camada epitelial, necrose e descamação das células digestivas) e inflamação (como por exemplo, infiltração de hemócitos no tecido conjuntivo, formação de granulócitos, encapsulamento). No estudo de Vargas e colaboradores realizado em 2015, observaram nas brânquias de tambaqui (*Colossoma macropomum*), distúrbios inflamatórios acompanhado de células granulosas eosinofílicas, assim como tentativas de adaptação, como por exemplo hiperplasia epitelial, fusão lamelar, atrofia lamelar e distúrbios de crescimento em quase todos os seus exemplares. Os mesmos autores afirmam também que das lesões observadas em bivalves, nem todas elas eram derivadas a parasitas, mas sim a diversos fatores ambientais tais como pH ácido e concentrações elevadas de CO₂.

Também é do conhecimento geral que animais, em especial bivalves que vivem em condições de poluição crónica tornam-se mais suscetíveis a infeções parasitárias comparativamente a animais que vivam em ambientes mais limpos (Usheva, *et al.*, 2006). E por se apresentarem em ambientes poluídos, estes bivalves podem revelar lesões degenerativas, tais como vacuolização, atrofia, lipofuscinose (doença neurodegenerativa por depósito anormal de lipopigmentos), lesões destrutivas tais como redução da camada epitelial, necrose e descamação de células digestivas e basófilas e lesões inflamatórias como infiltração de hemócitos no tecido conjuntivo, formação de granulocitomas, encapsulamento, assim como a presença de células

castanhas por acumulação de substâncias tóxicas, como por exemplo, pesticidas, metais pesados, carboidratos de origem de petróleo ou derivados, entre outros, tornando estas células um biomarcador de poluição local (Usheva, *et al.*, 2006).

Glândula digestiva

A glândula digestiva dos bivalves, o centro da atividade principal da digestão endocelular, é um órgão de enorme importância (Usheva *et al.*, 2006) e é altamente dinâmico e sofre alterações e transformações morfológicas constantes nos alvéolos digestivos. O ritmo da alimentação abrange três fases que são influenciadas ao ritmo das marés: absorção, retenção e desintegração (Langton, 1975; Robinson, & Langton, 1980; Morton, 1983; Owen, 1996). Existem inúmeros motivos e fontes para o epitélio digestivo necessitar de tamanha atividade, desde a sua alimentação, a renovação epitelial e agressões e *stresses* exógenos, como mudanças na disponibilidade de alimentos, poluentes e biotoxinas podem provocar alterações nos alvéolos além do intervalo normal de variabilidade, levando ao afinamento epitelial (Couch, 1984; Winstead, 1995; Smolowitz, & Shumway, 1997; Ellis, *et al.*, 1998).

A glândula digestiva dos bivalves, para além de estar envolvida em processos digestivos, é também o centro de acumulação e desintoxicação de substâncias orgânicas e inorgânicas, o que faz dela um órgão de extrema importância, sujeita a sofrer lesões que, em simultâneo, causam impacto no bivalve (Morton, 1971; Lowe, *et al.*, 1981; Auffret, 1988; Lowe, 1988; Cajaraville, *et al.* 1990; Cajaraville, *et al.*, 1992; Usheva, *et al.*, 2006). Este órgão, conforme já se demonstrou em estudos anteriores, trata-se de um órgão sensível ao impacto agressivo de vários agentes agressores no ambiente marinho. Devido a esta sensibilidade, tem sido alvo de inúmeros estudos e programas de biomonitorização de poluentes ambientais marinhos, como por exemplo metais pesados e pesticidas e agentes infecciosos. A glândula digestiva dos bivalves é também um centro de atividades fisiológicas e ambientais (alterações climáticas diárias e anuais), cujas três fases do ciclo digestivo, podem variar um pouco na sua manifestação e duração, dependendo do bivalve. Estas variações devem ser tomadas em conta quando são observadas amostras histológicas pois podemos presenciar qualquer uma delas, levando a diagnósticos errados aos olhos de um observador inexperiente (Usheva, *et al.*, 2006).

Vários agentes causadores de *stress* possuem um papel nas alterações morfológicas dos túbulos da glândula digestiva, como atrofia epitelial, assim como também a disponibilidade de alimento, *stress* salino e térmico, bem como a exposição a poluentes podem também eles produzir

alterações morfológicas da estrutura da glândula digestiva, podendo resultar na incapacidade das funções digestivas e de armazenamento (Owen, 1996; Carella, *et al.*, 2015a).

Em observações de bivalves que viviam em ambientes poluídos, notou-se que existia uma maior predisposição para infecções bacterianas e parasitárias e que estes bivalves também apresentavam células castanhas, que se tratavam de células preenchidas de vacúolos lisossômicos castanhos, usados como biomarcador para análise de poluição (Usheva, *et al.*, 2006).

Segundo Souza (2014), o parasita *A. ocellatum* causa lesões diversas em ostras *C. gigas*. No trato digestivo foi observado diapedese de hemócitos para o tecido epitelial e inflamação como sintomas iniciais, sendo acompanhados posteriormente por lesões severas no tecido conjuntivo e epitelial, seguido de necrose. A autora refere também que o trato digestivo é o mais afetado pela resposta inflamatória (Galimany *et al.*, 2008; Souza, 2014).

Brânquias

As brânquias, o órgão mais importante na respiração e alimentação da ostra, é o primeiro a entrar em contacto com o exterior. Em contacto com o parasita *A. ocellatum* a ostra demonstra um aumento na produção de muco como uma reação adversa primária ao parasita (Souza, 2014). Souza (2014) afirma que a produção de muco seja um mecanismo de defesa para evitar a continuação do contacto com o agente agressor ou para diminuir a ingestão de toxinas. As lesões evoluem posteriormente para hipertrofia, hiperplasia e mais tarde (48 horas) para lesões sérias nos filamentos branquiais e necrose caso o contacto com o parasita se prolongue.

Também Souza, (2014) demonstrou em ensaio experimental que o consumo de oxigénio da ostra sem a presença do parasita é de 0,41 mg h g⁻¹ e na presença deste é de 0,20 mg h g⁻¹, o que leva a concluir que a presença do parasita altera significativamente o comportamento natural da ostra. No entanto, esta é capaz de depurar/filtrar todos os parasitas presentes em menos de 48 horas, numa concentração de 1951,6 células/ml⁻¹ de um tanque com 500 L.

1.3 Patologias que afetam os organismos marinhos de aquacultura

Tanto em condições naturais como artificiais de cultivo, os organismos marinhos são constantemente alvo de ataques de agentes patogénicos (Vargas *et al.* 2015). Existem inúmeras formas de separar as diversidades destes agentes, como por exemplo físicas, químicas e biológicas. Para simplificar o tratamento a que se necessita recorrer, a separação mais comumente encontrada é em doenças infecciosas e não-infecciosas. Dentro das infecciosas encontramos as doenças com origem em bactérias, fungos, vírus e parasitas, sendo esta última, aquela que mais causa mortalidade em peixes (Soares, 2018).

Estes agentes infecciosos requerem determinadas condições, para que se desenvolvam com o hospedeiro, nomeadamente condições ambientais, como explicado na Figura 4. Estes agentes podem ser obrigatórios ou facultativos quando nos referimos à sua necessidade de encontrar um hospedeiro. Estes últimos, geralmente, não afetam o desenvolvimento do peixe ou o seu estado de saúde e são controlados pelas defesas do organismo, no entanto, caso as condições se tornem desfavoráveis aos peixes como por exemplo as carências de oxigénio, alterações de temperatura, sobrepopulação, acumulação de toxinas na água, entre outros, as suas defesas naturais tendem a diminuir e, nessas ocasiões os organismos oportunistas tornam-se patogénicos, causando altas taxas de mortalidade em explorações de aquacultura (Vargas, *et al.* 2015).

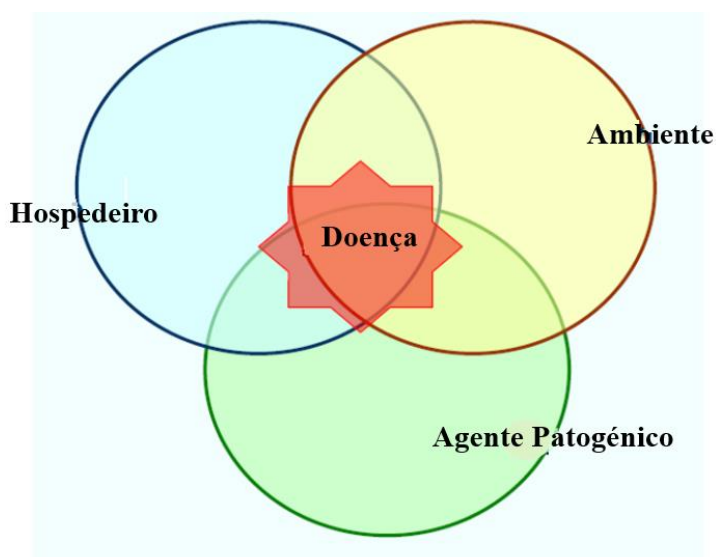


Figura 4. Diagrama exemplificativo das várias condições necessárias à ocorrência de doença.

Dentro das doenças não-infecciosas, encontramos as doenças de origem física/ambiental, química, nutricional e genética. As doenças físicas/ambientais referem-se às doenças causadas quando o meio onde o organismo se encontra não é o adequado para a sua sobrevivência tais como a temperatura, salinidade, concentração de oxigênio disponível, etc. Em situações de doenças com origem química deve-se à presença de um composto de origem animal/biotoxinas (como por exemplo HABs) ou antropogénica (Usheva *et al.*, 2006; Carella *et al.* 2015b). Doenças de origem nutricional podem dever-se, tanto por excesso como por carência de um nutriente específico. Em regra, é por carência de um nutriente essencial, não produzido pelo organismo como as vitaminas e sais minerais. As doenças de origem genética ocorrem por defeito do código genético, podendo resultar em inúmeras malformações como neoplasias ou problemas no esqueleto (Carella *et al.*, 2015^a; Soares, 2018).

1.4 *Amyloodinium ocellatum*

O parasita *A. ocellatum* (Brown, 1931) (Fig. 5 e 6), também conhecido por “marine velvet” (veludo marinho) é um dinoflagelado, ectoparasita obrigatório, unicelular, termofílico, eurialino, cosmopolita (Lom & Dyková, 1992; Ramos, & Oliveira, 2001) e extremamente virulento, e que tem demonstrado ser um problema sério para quaisquer explorações de aquacultura, zoo marinho¹, entre outras, devido à rápida mortalidade em quase todas as espécies de peixes teleósteos e acredita-se que o mesmo ocorra com os elasmobrânquios (Ramos & Oliveira, 2001; Alvarez-Pellitero, 2008)



Figura 5. Fotografia de dinósporo de *Amyloodinium ocellatum* ampliada 400x em microscópio retirada em observação durante o ensaio experimental

. Por todo o mundo, quer estes se encontrem em água salgada, salobra, águas contaminadas ou em peixes de água doce se mantidos em salinidades baixas, causando enormes perdas se não for tratada a tempo (Brown & Hovasse, 1946; Lom & Dyková, 1992; Reed & Francis-Floyd, 1994; Noga & Levy, 1995; Soares *et al.* 2011; Souza, 2014; Gómez & Gast, 2018). Foi relatado pela primeira vez numa exploração de aquacultura na área do Mediterrâneo (Fioravanti *et al.* 2006; Sousa, 2014) e na região vizinha de Eilat no Mar Vermelho (Paperna, 1980). Só em 1994 é que a doença foi diagnosticada em Portugal em douradas (*Sparus aurata*) produzida em aquacultura (Menezes, 1994) e em populações naturais de robalo (*Dicentrarchus labrax*) na lagoa costeira de Óbidos e no estuário do Sado (Menezes, 1994; Menezes, 2000).

As zonas mais atingidas incluem o Mediterrâneo, Mar Vermelho e o Golfo do México (Southgate, 1993; Ramos & Oliveira, 2001) e as espécies comerciais mais atingidas são o robalo

¹ Embora os zos marinhos, zoológicos e aquários de exposição não tenham, por norma, as concentrações de peixes que encontramos nas explorações de produção, o parasita não perde importância devido ao amplo espectro de hospedeiros e isso inclui teleósteos e elasmobrânquios (Keller, 2006; Francis-Floyd & Floyd 2011).

em Israel (Paperna, 1980), Portugal (Menezes, 1994), em Lagoa de Óbidos e Estuário do Sado e em Itália (Ghittino, 1980; Chrisfilogiannis, 1993). É igualmente afetada a dourada em França (Paperna & Braudin Laurencin, 1979), Israel (Paperna & Baudin-Laurencin, 1979; Paperna, 1980), Itália (Barbaro & Francescon, 1985), Jugoslávia (Paperna, 1983) e Portugal (Menezes, 1994). Existem para além destas espécies, muitas outras que já foram alvo de amiloodiniose por todo o mundo, como a cobaia produzida no Brasil (Moreira, *et al.*, 2013; Gómez & Gast, 2018).

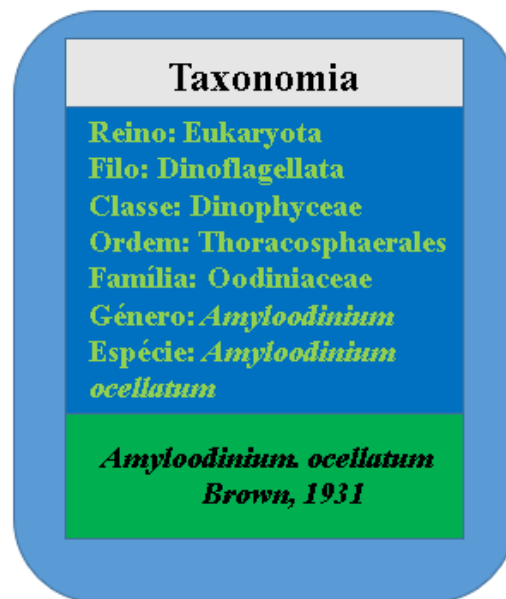


Figura 6. Taxonomia do parasita *Amyloodinium ocellatum*, adaptado do livro *Protozoan of Fishes* (Brown & Hovasse, 1946)

Concretamente em Portugal, desde 2000 que este parasita tem sido diagnosticado com frequência nas explorações de aquacultura, causando mortalidades elevadas em robalo, dourada, pregado (*Psetta maxima*), ano após ano (Saraiva *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011; Sorares *et al.*, 2012). Em 2010, Espanha sofreu uma infeção de tal maneira severa que a associação de aquacultura espanhola viu-se forçada a pedir ajuda ao estado espanhol para repor as perdas causadas por este parasita (Soares *et al.*, 2011).

O parasita além de infetar peixes pode, também, infetar crustáceos e bivalves (Moreira *et al.* 2017), causando hiperparasitação noutros parasitas de peixes como *Neobenedenia melleni* e causa reação tecidual moderada a intensa em várias espécies de camarão importantes do ponto de vista comercial (Aravindan *et al.*, 2007; Francis-Floyd & Floyd, 2011). É considerado hoje um dos maiores problemas para as explorações de aquacultura de água salgada, causando perdas enormes, tornando-se assim um dos parasitas patogénicos mais importantes em águas marinhas e salobras

(Francis-Floyd & Floyd, 2011; Gómez & Gast, 2018), especialmente se aquecidas e em sistemas fechados (Kuperman & Matey, 1999; Noga, & Levy, 2006; Francis-Floyd & Floyd, 2011).

O agente da amiloodiniose, no meio ambiente natural, raramente causa mortalidade, no entanto, o mesmo não se verifica em cativeiro, onde espaço é mais limitado e se potencia a proximidade e a densidade entre os peixes, favorecendo a sua propagação, como demonstrado na Figura 7, mesmo que o parasita não se transmita diretamente de peixe para peixe (Francis-Floyd & Floyd, 2011; Souza, 2014). Esta propagação pode ser acelerada quando falamos de sistemas intensivos, com temperaturas e salinidades ideais (Paperna, 1984). A amiloodiniose manifesta-se por surtos rápidos e assintomáticos, com mortalidade e morbidade aguda (cerca de 100%) nas instalações de aquacultura (Becker, 1977; Lawler, 1980; Paperna *et al.*, 1981; Lauckner, 1984; Noga, 2010; Soares *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2017) e trata-se de um problema sério tanto para peixes de produção como para peixes ornamentais (Noga & Levy, 1995; Soares *et al.* 2012).

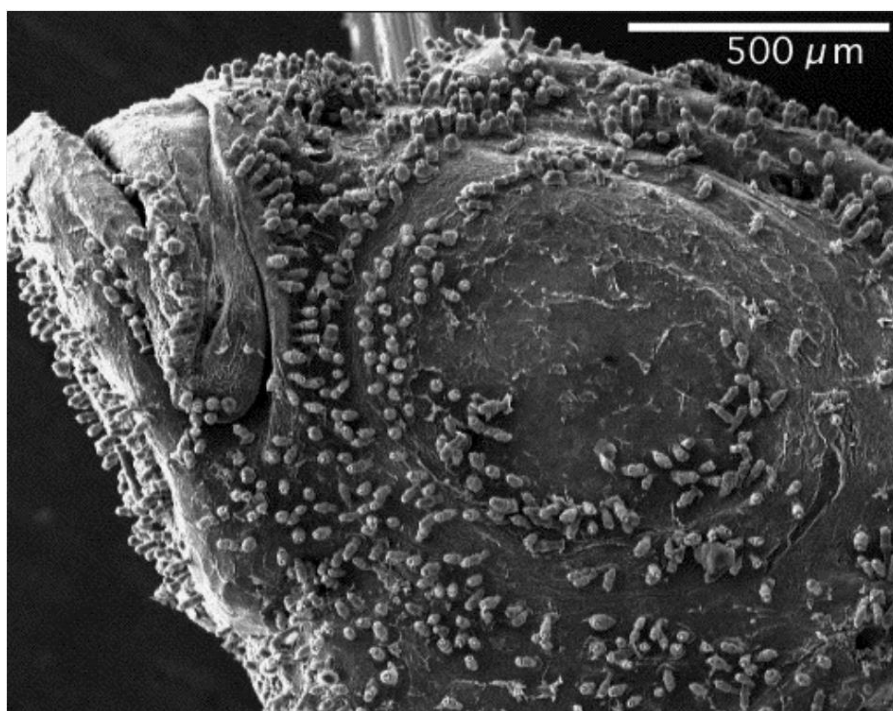


Figura 7. Micrografia de tilápia (*Oreochromis niloticus*) infestada de *Amyloodinium ocellatum*, na sua fase adulta (trofonte).
Fonte: GIA – aquacultura, meio ambiente e desenvolvimento. Disponível em: <https://gia.org.br/portal/amyloodinium-ocellatum/>

A. ocellatum trata-se do único dinoflagelado registado deste género (*Amyloodinium*), possuindo um único núcleo, três membranas reforçadas com placas tecaís (referido como “armadura virtual”), dois flagelos móveis de tamanhos desiguais (na sua fase móvel), sendo um deles transversal e outro longitudinal no sulco ventral. A sua reprodução é assexuada (Brown & Hovasse, 1946). Apresenta características complexas que o aproximam entre células animais e células vegetais (Zambrano *et al.*, 2001).

Este parasita é mais ativo quando a temperatura da água se encontra entre os 16°C e os 30°C. O que, em Portugal, coincide com o período em que as pescas são mais frequentes, o que também aumenta o *stress* a que os animais são submetidos. (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Na Figura 8 podem ver-se trofontes (A) e tomontes (B) de *Amyloodinium*, durante um surto que ocorreu em 2011 na EPPO de Olhão, em corvinas (Soares *et al.*, 2012).

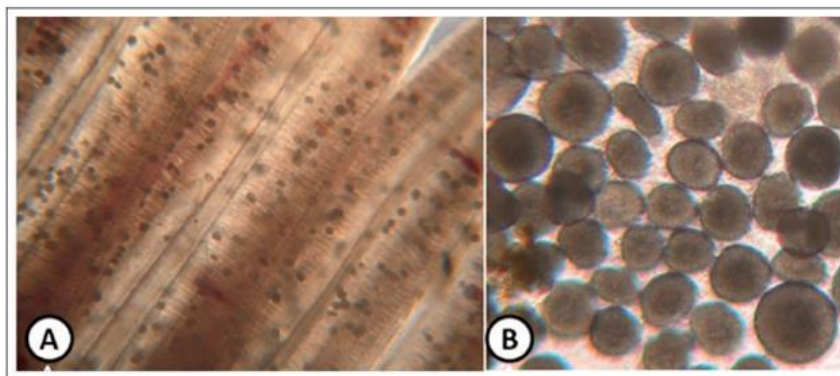


Figura 8. Imagem microscópica de trofontes (A) e tomontes (B) de *Amyloodinium ocellatum* em brânquias de corvinas (*Argyrosomus regius*) (40x) Adaptado de Soares *et al.* (2012)

Existe alguma discordância na comunidade científica sobre a diversidade deste parasita. Os que suportam a ideia de que pelos estudos genéticos, sugerem que o *A. ocellatum* de diversas origens geográficas e de diferentes espécies de peixes são, na verdade, a mesma espécie (Levy *et al.*, 2007; Francis-Floyd & Floyd, 2011), possuindo um tronco-comum ou um organismo ancestral em comum com os dinoflagelados ectoparasitas *Paulsenella* e *Tintinnophagus* e o grupo *Pfiesteria* (género de dinoflagelados heteroficos capazes de produzir HABs e causar a morte de peixes) (Gómez & Gast, 2018), enquanto outros sugerem que existem várias espécies (Landsberg *et al.* 2002). Existem também registos de tolerâncias diferentes em relação à salinidade e temperatura (Levy *et al.*, 2007) mas que acreditavam ser a mesma espécie, admitindo a hipótese da existência de subespécies ou estirpes.

Em um estudo realizado por Reed e Francis-Floyd (1994) afirmam que o parasita é suspeito de produzir uma toxina semelhante à de algumas algas, causadoras de “marés vermelhas”, devido à sua semelhança com os protozoários em que foi agrupado no passado².

² Os efeitos causados em explorações de aquacultura, por ação dos parasitas tem sido invocado por alguns autores (Vargas, *et al.*, 2015) quanto à sua frequência, perdas e consequências na fauna de determinadas regiões. Quando o ambiente se encontra contaminado com poluentes nocivos e toxinas (seja de origem animal ou humana) que debilitam os mecanismos de defesa do peixe, associado a condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do parasita, a mortalidade do peixe é frequente (Montaudouin *et al.*, 2010; Chu *et al.*, 2003)

1.4.1 Ciclo de vida do parasita, tolerância a salinidade e temperatura e modo de transmissão

O ciclo de vida do parasita *A. ocellatum* é considerado complexo comparado com o de muitos outros parasitas de peixes (Reed & Francis-Floyd, 1994) e simples ao mesmo tempo, por exigir apenas a presença de um hospedeiro a fim de completar o seu ciclo (Francis-Floyd & Floyd 2011), juntamente com as condições ambientais propícias. Como já foi referido no ponto 1.4, o parasita aparenta não ser específico, infectando a maioria dos peixes teleósteos (Brown & Hovasse, 1946) e, embora haja elasmobrânquios infectados, não é muito comum nestas espécies (Ramos & Oliveira, 2001; Alvarez-Pellitero, 2008). É um parasita capaz de infectar peixes na fase larvar, pós-larvar, assim como peixes adultos (Paperna, 1984). Também se acredita que o parasita possa ser transmitido a partir de fômites tais como materiais de trabalho e vetores (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

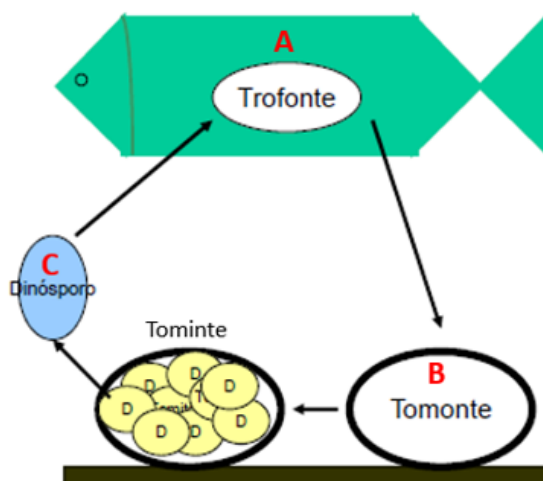


Figura 9. Ciclo biológico de *Amyloodinium ocellatum* (Adaptado de Parasitologia Animal 2011/2012 Faculdade de Ciências – Universidade do Porto)

Amyloodinium ocellatum apresenta três fases bem definidas no seu ciclo biológico (Fig. 9), trofonte (A), tomonte (B) e dinósporo (C) mas nem sempre ocorre estas três fases (Souza, 2014). Sendo um parasita obrigatório, numa das fases da sua vida, necessita de estar em contacto com o hospedeiro para completar o seu ciclo de vida. A esta fase parasitária dá-se o nome de trofonte e é considerada a fase adulta do parasita (Fig. 9 - A e Fig. 10), onde este mantém o contacto com o hospedeiro por 2 a 5 dias (em temperaturas ideais que se situam nos 24°C), podendo demorar mais em temperaturas mais baixas. É a partir de uma estrutura semelhante a uma raiz, denominada de rizóide, que se estende pela região do sulco e tem a capacidade de penetrar profundamente no epitélio do hospedeiro. Neste ponto de fixação, causa danos consideráveis e é dessa forma que garante a sua adesão e alimentação (Brown & Hovasse, 1946; Francis-Floyd & Floyd, 2011). O

rizóide também é referido como um pedúnculo curto capaz de irradiar projeções filiformes que se encontra localizado próximo de uma outra estrutura que aparenta ser um tentáculo móvel, chamado de estomatópode, com 30 μm , que se estende desde a zona basal da célula até ao fim da mesma (zona apical) e que se acredita, que sirva de entrada de alimento (Brown & Hovasse, 1946; Ramos & Oliveira, 2001). O parasita, quando na sua fase adulta e mesmo sendo classificado como ectoparasita, pode ser encontrado aderente ao hospedeiro em várias zonas do corpo (p.e. pele, olhos, barbatanas, submucosa, músculo e tecido conjuntivo da faringe e rim anterior), sendo as brânquias o local preferencial. (Brown & Hovasse., 1946; Paperna, 1984; Ramos & Oliveira, 2001), causando lesões locais que serão aprofundadas mais a frente. Quando o parasita se encontra como trofonte (Fig. 9 – A), encontra-se num estado vegetativo, imóvel e fixo ao seu hospedeiro (Souza, 2014). O trofonte tem um formato de “saco” irregular, entre piriforme e ovoide, com cerca de 150 μm de comprimento (em situações especiais, alcança os 350 μm). Possui um núcleo esférico de 16 μm de diâmetro, rodeado por uma zona de citoplasma que apresenta vários organelos celulares, vacúolos digestivos de dimensões variadas e inclusões (Brown & Hovasse, 1946).

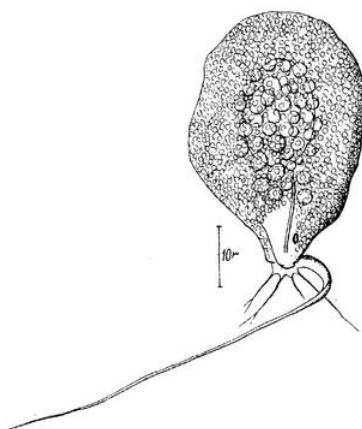


Figura 10. Esquema do parasita *Amyloodinium ocellatum* na sua fase adulta (trofonte). Fonte: GIA – aquacultura, meio ambiente e desenvolvimento. Disponível em: <https://gia.org.br/portal/amyloodinium-ocellatum>

O tomonte (Fig.9 – B) é encarado como uma fase avançada do trofonte, que quando ganha volume suficiente se liberta do hospedeiro (Souza, 2014). Quando tal acontece, o parasita recolhe e reabsorve as lâminas de adesão (rizóides) e deposita-se no fundo e em poucos minutos inicia a sua transformação, produzindo uma barreira (quisto), ganhando um formato arredondado ou oval (Ramos & Oliveira, 2001) e dá início a uma sucessão de divisões seguidas (3 a 6 horas após a retração dos rizóides) e apresenta em média 80-90 μm a 20-25° C (Paperna, 1984), não se conseguindo reproduzir abaixo dos 15°C (Brown & Hovasse, 1946; Paperna, 1984; Francis-Floyd & Floyd, 2011) O tomonte contém 2^ª tomites (Fig. 9) de tamanhos iguais, dividindo-se de forma sincronizada, como um padrão, dentro do tomonte, podendo ir até um máximo de 128 tomites,

necessitando para isso de 7 divisões ($n=7$), dividindo-se estes uma última vez e originando 256 dinósporos (C – Fig. 9), a fase infetante, móvel e livre do parasita, por fissão binária (em condições ideais constantes, necessita de 9-12 horas até à divisão final) (Paperna, 1984; Souza, 2014). O processo pode levar 3 dias a uma temperatura de 25-26°C (Brown & Hovasse, 1946) e nunca menos de 24 horas (Paperna, 1984). Sempre que um trofonte se separa de um hospedeiro (seja natural ou removido artificialmente), transforma-se em tomonte com capacidade de divisão. Nem todos, mas em alguns trofontes, com menos de 24 horas e com menos de 25 µm de comprimento, dão origem a um único dinósporo sem divisão (Brown & Hovasse, 1946) e em situações em que a temperatura da água desce para 10°C ou menos, a divisão celular termina. Quando a temperatura se situa entre os 22-25°C, numa salinidade entre 16,7 e 28,5 ppt, o ciclo completa-se em 3 a 5 dias (Reed & Francis-Floyd, 1994), sendo, no entanto, afetado pela temperatura e/ou por condições ambientais adversas/incompatíveis (Paperna, 1984).

Os dinósporos, libertam-se da parede protetora que tinha sido formada pelo tomonte e iniciam, assim, a sua busca por um hospedeiro, possuindo capacidade de infeção durante, pelo menos 15 dias após a sua libertação do quisto (Brown & Hovasse, 1946; Reed & Francis-Floyd, 1994), sendo que a infeção ocorre por contacto direto entre os dinósporos ativos de *A. ocellatum* e o hospedeiro, podendo estes ser da água contaminada ou também de gotículas de aerossóis (Roberts-Thompson *et al.*, 2006; Francis-Floyd & Floyd, 2011). Quando os dinósporos são libertados, são mais pequenos que os tomontes, medindo cerca de 12 a 15 µm de diâmetro (Paperna, 1984; Reed & Francis-Floyd, 1994). Esta é a fase infetante e móvel e é considerada a fase livre do parasita, nadando até encontrar um hospedeiro. Uma vez fixados, os dinósporos, perdem o flagelo e entram no estágio parasitário, completando o ciclo e transformando-se, novamente, em trofontes (Reed & Francis-Floyd, 1994; Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Tendo o parasita uma fase do seu ciclo que necessita de ser fora do hospedeiro, não existe uma transmissão direta de peixe para peixe, mas sim a partir de água contaminada com o parasita. (Reed & Francis-Floyd, 1994).

Tendo em conta que há uma grande probabilidade de existirem várias estirpes do parasita, é lógico concluir que, por uma questão de seleção natural, nem todos vão apresentar as mesmas tolerâncias à temperatura e à salinidade. Francis-Floyd e Floyd (2011) apresentam como exemplo que no mar vermelho o parasita é menos tolerante a salinidades mais baixas como ocorre no Golfo do México. Todos os organismos aquáticos são influenciados pelas mudanças climáticas e os parasitas, pelo seu tamanho reduzido, são até dos mais suscetíveis. Esta sensibilidade manifesta-

se quando ocorrem alterações de temperatura que afetam diretamente o seu ciclo de vida, transmissão e biologia do hospedeiro (Adlard & Smit, 2015; Moreira *et al.*, 2017). Embora o tema seja difícil de delinear devido às adaptações do parasita à zona onde se encontra pelo mundo, como já foi referido anteriormente (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Durante todas as fases da vida do parasita, a tolerância à temperatura depende muito da salinidade, assim como a tolerância à salinidade depende muito da temperatura. Os limites e ideais de temperatura e salinidade variam um pouco em cada fase do parasita, assim como de região para região como já referido. De uma forma geral, o parasita é ativo entre 16 e 30°C e entre 12 e 50 ppt (Paperna, 1984).

Quando o parasita se encontra sujeito a temperaturas ou salinidades fora das ideais ou quando sujeito a tratamento medicamentoso, as divisões dos tomites podem até parar, mas isto não significa que não possam retomar, uma vez que este sobrevive se a dose não for letal para o peixe. O retorno ao ciclo de vida pode ter início quando o ambiente exterior assim o permita (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Os fatores que promovem que o parasita se liberte do hospedeiro são o aumento de crescimento do parasita (1), acreditando-se que devido ao aumento do tamanho, existe um aumento da fricção entre o hospedeiro e o parasita, assim como uma fixação menos eficaz pelos rizóides (Lom & Lawler, 1973) e a zona de adesão se se encontrar demasiado necrosada e hiperplásica para favorecer a adesão (2). A separação/desapego também pode sofrer um atraso/adiamento de 4-7 dias em situações em que a temperatura desça e a atividade do peixe abrande (Paperna, 1984).

Os autores Ramos e Oliveira, (2001) observaram que uma luminosidade intensiva aparenta ser o fator que, juntamente com a temperatura e salinidade, mais tem influenciado a reprodução do parasita (Eiras, 1994).

1.4.2 Sensibilidade dos peixes à amiloodiniose

A amiloodiniose tem demonstrado ser problemática para os peixes, mas não de igual modo. Existem peixes que lidam com a doença com mais dificuldade que outros, do mesmo modo como uns também manifestam os sintomas de forma mais evidente que outros. Um peixe é considerado altamente infetado quando apresenta duzentos (200) ou mais trofontes por filamento de brânquia, (Brown & Hovasse, 1946). Nestas situações, os peixes tendem a apresentar sinais clínicos que podem ser mais ou menos evidentes, dependendo de vários aspetos como a espécie, a densidade do tanque, a carga parasitária e a presença de outros fatores de *stress* (Brown & Hovasse, 1946).

Existem registos de espécies consideradas mais sensíveis às infeções por *A. ocellatum* como por exemplo as raias, especialmente a arraia-atlântica (*Dasyatis sabina*) (Brown & Hovasse, 1946), o tambor vermelho (*Sciaenops ocellatus*) que é extremamente sensível (Reed & Francis-Floyd, 1994), o robalo riscado (*Morone saxatilis*), o peixe palhaço (*Amphiprion sp.*), o robalo muge (*Morone saxatilis*), o robalo europeu ou o robalo legítimo (*Dicentrarchus labrax*), a perca-gigante (*Lates calcarifer*), o pampo (*Trachinotus sp.*), o charuteiro catarino (*Seriola dumerili*), a dourada (*Sparus aurata*), a tilápia-de-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) (Francis-Floyd & Floyd, 2011),

No caso da tainha (*Mugil cephalus*), os autores contradizem-se. Francis-Floyd e Floyd (2011) afirmam que ocorreram surtos graves, enquanto outros autores (Brown & Hovasse, 1946) afirmam que é uma espécie pouco suscetível ao parasita. Os autores Francis-Floyd e Floyd (2011) afirmam que as espécies peixe-palhaço e tambor vermelho são especialmente suscetíveis ao parasita.

Por outro lado, encontramos espécies que não aparentam sofrer significativamente com a presença do parasita como por exemplo a enguia-americana (*Anguilla rostrata*), o peixe-sapo do Golfo (*Opsanus beta*), o “killifish de nariz comprido” (tradução adaptada) (*Fundulus similis*) e a *Menidia beryllina* (espécie nativa do Leste da América-do-Norte), que sobrevivem a exposições em massa (Brown & Hovasse, 1946).

Existem também estudos que pretenderam comparar espécies como foi o caso da dourada (*Sparus aurata*) (Soares et al, 2012) e da corvina (*Argyrosomus regius*) onde foi observado que ambas a espécies manifestaram comportamentos distintos, onde a corvina apresentou ser

claramente mais resistente e tolerante à presença do parasita *A. ocellatum* (mortalidade de 29% das douradas e 1,2% corvinas em dois dias). A corvina aparenta ainda ser mais resistente a doenças em geral e a deformações larvares, quando comparada a outras espécies produzidas em aquacultura (Soares *et al.* 2018), o que a torna uma espécie interessante na procura de uma exploração que seja sustentável e com menores perdas económicas.

A resistência à infeção ao parasita envolve as imunidades inatas e adquiridas (Dickerson & Clark, 1996; Woo, 1996; Ramos & Oliveira, 2001). Existem espécies que adquirem imunidade mediada por anticorpos específicos após uma exposição sub-letal ao mesmo (Paperna, 1980; Lawler, 1980; Ramos & Oliveira, 2001).

1.4.3 Sinais clínicos e lesões macroscópicos e microscópicos

De uma forma geral, as células possuem uma capacidade de se adaptar a estímulos (umas mais que outras) que comprometem a sua sobrevivência, como por exemplo agentes patogénicos do meio ambiente. Os meios utilizados pela célula, a fim de se adaptar, podem acabar ultrapassados quando se tratam de *stresses* extensos e/ou crónicos que vencem a capacidade de recuperação celular. Este conceito forma a base de todas as doenças (Carella *et al.*, 2015a).

A doença em si, como resultado de uma lesão celular, representa um “ponto final” na capacidade de adaptação de um organismo face aos *stresses* a que estiver sujeito (exógenas ou endógenas) que podem também ser classificados em fatores físicos, químicos e/ou biológicos e assim, a base das doenças deve-se a uma alteração morfológica, bioquímica e funcional das células. O estudo desta área (doenças em animais) é amplamente explorado e numa perspetiva médica/veterinária deve-se à procura de possíveis tratamentos (seja ela para uso individual ou coletivo). Neste caso, tem uma grande relevância na produção animal (Carella *et al.*, 2015a)

Conforme referido anteriormente (no ponto 1.4), o parasita *A. ocellatum*, em meio natural, raramente causa mortalidade, mas o seu potencial em espaços fechados, como acontece em tanques de aquacultura, aumenta consideravelmente, porque estes ambientes promovem a densidade entre peixes e dessa forma, a propagação do parasita (Souza, 2014). Provoca surtos rápidos e assintomáticos, com mortalidade e morbilidade aguda, próxima dos 100% por todo o mundo (Lawler, 1980; Paperna *et al.*, 1981; Noga, 2010, Soares *et al.*, 2011; Moreira, 2017). De uma forma geral, os peixes apresentam esses mesmos sinais clínicos agudos antes de morrer (Fig. 11), mas isso não descarta a hipótese de que possam morrer antes de os conseguir manifestar, principalmente se a infeção se concentrar nas brânquias (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Sinais clínicos macroscópicos

Os primeiros sinais que os peixes apresentam são comportamentais, como sinais de desconforto, batimento opercular acelerado, movimentos bruscos, natação à superfície (onde a água é mais rica em oxigénio), perda de apetite, aumento da frequência respiratória, roçam-se em objetos dentro de água e reproduzindo esguichos de água para tentar limpar as brânquias (Brown & Hovasse, 1946; Soares *et al.*, 2011; Souza, 2014; Moreira *et al.*, 2017;). Todos estes comportamentos são muitas vezes referidos como natação errática, principalmente porque o parasita também causa opacidade ocular. Os sinais são observados em regra primeiro nos peixes

enfraquecidos ou mais stressados e são, por norma, fatais se o parasita se encontrar em ambiente fechado com o hospedeiro, especialmente quando a densidade populacional é elevada. (Brown & Hovasse, 1946; Lawler, 1980). Quando observamos os peixes infetados, podemos observar olhos opacos, manchas na pele e barbatanas (Souza, 2014), manchas de pele (despigmentação ou hiperpigmentação), congestão e erosão das barbatanas. Em fases extremamente avançadas, mesmo que o peixe já tenha morrido, e seja esquecido no tanque, pode ser observado a olho um brilho opaco ou acastanhado, com perdas e acumulação irregulares de muco (Reed, & Francis-Floyd, 1994) ou hipersecreção da mucosa cutânea e dilatação do ventre (Ramos & Oliveira, 2001). Esta despigmentação ou hiperpigmentação é normalmente acompanhada por uma coloração branca ou castanha ou de aparência turva e é mais evidente quando visto com uma iluminação indireta, como uma lanterna (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Infelizmente, muitas vezes a observação dos primeiros sinais que revelam a presença de *A. ocellatum* no tanque começa pela constatação de um peixe moribundo ou já morto no tanque. Quando tal acontece, nunca se deve descartar a hipótese de existir o parasita no tanque, quando estamos em presença de tanques de água salgada ou salobra (Reed & Francis-Floyd, 1994).

Lesões microscópicas

Como já foi referido (em 1.4.2), um peixe, quando se encontra altamente infetado, apresenta 200 (duzentos) trofontes ou mais por filamento de branquia (Brown & Hovasse, 1946) mas os sinais ocorrem muito antes de atingirmos estes números. As lesões causadas por rizóides correm quando o parasita se encontra fixado no hospedeiro, ou seja, na sua fase adulta denominada de trofonte. Devido ao modo como os rizoides penetram e destroem as células epiteliais, estes causam hiperplasia, inflamação, hemorragia e necrose. Todos estes sintomas são mais ou menos evidentes, consoante as espécies infetadas, o tempo a que os peixes estiveram expostos aos parasitas, a carga inicial, a temperatura, a salinidade e o tipo de sistema (especialmente se fechado) (Gómez & Gast, 2018).

Os peixes, quando observados, demonstram dano imediato, após a fixação dos parasitas (trofonte), generalizado no epitélio, especialmente no epitélio branquial que acaba “engolido”, apresentando-se edemaciado, hiperplásico, com inflamação hemorrágica, resultando em necrose dos filamentos branquiais, conduzindo a anoxia, que aparenta ser a causa da morte do hospedeiro em 12 horas após a introdução do peixe num ambiente rico em dinósporos. Os fatores que vão determinar a velocidade a que o peixe morre é a sua resistência ao parasita e a sua tolerância a

baixas concentrações de oxigénio. (Brown & Hovasse, 1946; Lawler, 1980; Sousa, 2014; Moreira *et al.*, 2017). No entanto, existem relatos de mortalidades elevadas associadas a concentrações parasitárias baixas, que levaram a acreditar que se deveram a infeções microbianas secundárias e osmorregulação comprometida devido às lesões epiteliais graves identificadas, podendo o peixe apresentar-se emaciado, mas sem apresentar úlceras ou lesões difusas (Francis-Floyd & Floyd, 2011; Noga, 2012; Moreira, *et al.*, 2017).

1.4.4 Diagnóstico, medidas profiláticas e tratamentos

Como já referido, a amiloodiniose representa um importante obstáculo para a produção de aquacultura semi-intensiva (Moreira *et al.* 2017) e intensiva, sobretudo no sul da Europa e regiões com condições ambientais similares, sendo um dos mais sérios impedimentos para a produção de aquacultura em água morna (Noga *et al.* 2011; Soares *et al.*, 2011; Soares *et al.* 2012; Moreira *et al.* 2017), pelas perdas incontestáveis causadas por este parasita (Souza, 2014). Trata-se de uma doença “silenciosa” que impede um diagnóstico precoce e causa geralmente insucesso no tratamento, (Soares *et al.* 2011) isto porque quando os peixes manifestam sinais clínicos, já a carga parasitária é elevada. Dada a velocidade e a “forma silenciosa” de atuar deste parasita, a dimensão do impacto dos seus surtos vai depender em muito do momento em que é detetado. Por esse motivo, a exploração carece de uma vigilância de rotina como prevenção (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

1.4.4.1 Diagnóstico

Como já referido, sob condições ideais, o parasita completa todo o seu ciclo em menos de 1 semana (3 a 6 dias a 20°C), levando tanques à ruína em pouco dias (Soares *et al.* 2012; Souza, 2014), e como tal, significa que o sucesso da nossa intervenção e controlo vai depender essencialmente do tempo de diagnóstico e do tempo de reação. Por esse motivo, é recomendado que o método de diagnóstico escolhido seja rápido e sensível (Francis-Floyd & Floyd 2011).

Existem métodos que se podem utilizar para diagnóstico do parasita, sendo o mais consensual, por ser o mais simples, o mais barato e rápido, a utilização do microscópio ótico com uma amostra de branquia, raspagem de pele/escamas ou muco para procurar por trofontes, visto serem os locais mais comuns da sua fixação. Outros microscópios (ex: microscópio invertido e microscópio de disseção) também já foram utilizados e, obviamente, detetam o parasita mas em ambos estes últimos casos, falamos de microscópios mais sofisticados e consequentemente, mais dispendiosos (Gómez & Gast, 2018). Também é possível recolher amostras de água numa tentativa de identificar dinósporos ou recolher amostras do fundo em busca de tomites mas em ambas as situações, são muito mais difíceis de identificar, principalmente os dinósporo devido ao seu tamanho. Pode, no entanto, ser útil em infeções subclínicas através de PCR (Polymerase Chain Reaction/Reação em cadeia de polimerase), fazer a deteção de concentrações baixas de parasita.

Importa considerar esta medida num eventual programa de monitorização ambiental ou como medida de controlo (Soares *et al.*, 2011).

A utilização de testes genéticos trata-se de uma via extremamente sensível para a deteção de um único parasita. Esta técnica torna-se interessante quando o parasita existe em baixas concentrações, ou seja, de forma precoce ou em infeções sub-clínicas (Levy *et al.*, 2007). Sendo esta técnica já relativamente acessível do ponto de vista monetário, pode tornar-se interessante para as explorações utilizarem-na como rotina na monitorização de peixes suspeitos ou até mesmo em amostras de água, como parte integrante do protocolo de prevenção e controlo do parasita, saindo garantidamente menos oneroso o custo rotineiro do rastreio do que os tratamentos após a instalação do parasita, seja esta de exploração para consumo, seja de aquários de peixes ornamentais (Reed & Francis-Floyd, 1994).

Complementar ao diagnóstico, a análise hematológica pode ser uma ferramenta interessante na abordagem a este parasita para avaliar as respostas imunitárias a um surto de parasitas, assim como fornecer informações úteis como indicadores de saúde dos peixes, tais como dados relativamente à tolerância ao *stress*, distúrbios metabólicos, disfunções ou patologias reprodutivas. Resumindo, a análise hematológica tem sido utilizada para avaliar o estado de saúde de um tanque rotineiramente em algumas explorações (Moreira *et al.*, 2017).

Embora o diagnóstico seja direto, por ser fácil reconhecer a presença de trofontes numa ampliação a 400x, com o seu formato de pêra a esférico de cor castanho-escuro a dourado, com um tamanho variável como referido anteriormente, aderentes às brânquias ou pele, as estratégias de diagnóstico, prevenção, tratamento e manejo podem precisar de ser adaptadas consoante a espécie hospedeira, o destino do peixe (ornamental ou consumo) ou o desenho do sistema da exploração (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Como já referido (em 1.4), o parasita tolera intervalos amplos de temperatura e salinidade, o que o torna difícil de controlar por métodos físicos e químicos. No entanto, uma das metodologias inibidoras, utilizados numa tentativa de controlar o desenvolvimento do parasita, é a utilização de temperaturas abaixo de 15°C, que impossibilitam a reprodução do parasita, porém nem todos os peixes são compatíveis com temperaturas tao baixas (Soares *et al.*, 2011).

Procedimentos de biopsia podem ser fáceis, rápidos, baratos e úteis no diagnóstico de *A. ocellatum*, mas estes carecem de ser executados sem comprometer a amostra e, caso o animal não se destine a ser sacrificado no final, importa que não causem uma lesão séria ao animal e termine

em infecção iatrogénica. O procedimento de recolha de amostras de biópsia encontra-se no Anexo I O investimento necessário para a realização desta técnica de diagnóstico com capacidade de resultados precoces justifica e deve ser considerado essencial para um controlo bem-sucedido. Outro investimento recomendado é ter uma equipa operacional para verificar algum peixe sempre que possível (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Existem técnicas de recolhas de amostras de pele e técnica histológicas

Serologia: A identificação de *A. ocellatum* por resposta específica mediada por anticorpos ao parasita é possível, mas atrasada em peixes, portanto, não se considera adequada para detetar infeções precoces, mas pode ser útil na deteção de animais que tenham sido expostos ao parasita no passado (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Métodos moleculares: Autores como Levy (2007) descrevem que este método é sensível para detetar um único parasita de água salgada utilizando a técnica de PCR. Este método é interessante para detetar infeções subclínicas ou em programas de medicina preventiva (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Embora não seja comum a sua utilização, existem também outras técnicas como a eletroforese em gel e técnicas de “shotgun” e que podem ser interessantes mediante estudos específicos, assim como o plasma sanguíneo que tem sido utilizado igualmente em estudos de proteomas (conjunto de proteínas que podem ser encontrados numa célula quando esta está sujeita a um estímulo específico) e análises por se tratar de uma solução de várias proteínas e peptídeos, sendo útil como refletor das condições fisiológicas ou patológicas, representando uma boa fonte de biomarcadores em um surto de *A. ocellatum* (Moreira *et al.*, 2017).

1.4.4.2 Medidas profiláticas

Dada a falta de uma terapia eficaz numa situação de surto ou de diagnóstico positivo deste parasita, atualmente o método mais eficaz e mais barato, de combater este parasita baseia-se na prevenção. Assim, esta não se deve limitar apenas a impedir a entrada do parasita mas sim incluir medidas que, caso o parasita entre na exploração, determinem o modo de atuação e isso passa muito pela informação que os responsáveis de uma exploração dispõem, cabendo aos médicos veterinários responsáveis por explorações manterem-se atentos a novas investigações e a novos métodos dirigidos a lidar com este parasita. (Reed & Francis-Floyd, 1994).

Sendo a prevenção o combate preferencial contra o parasita, é necessário montar uma estratégia completa de forma a não ser necessário realizar tratamento. Essa estratégia carece de ser adaptada a cada exploração e a cada tipo de tanque em que se trabalha. A fim de esta ser eficaz, esta estratégia deve possuir alguns passos simples e que necessitam de ser realizados rotineiramente, tais como, realizar quarentena cuidadosa em peixes recém-chegados, que por definição significa isolamento do(s) peixe(s), à exploração antes da sua inserção em tanques de produção; monitorização e avaliação do tecido de branquial e barbatanas em microscópio ótico. Neste tempo, o peixe tem possibilidade de se adaptar, recuperar do transporte e de desenvolver algum agente infeccioso que traga consigo, evitando assim que este se propague e permitindo o seu isolamento, reduzindo, assim, o risco de epidemias na exploração (por ser mais provável que esta se manifeste no período de quarentena). Existem autores que referem que 30 dias seria o mais indicado. Caso o peixe morra durante a quarentena, deve ser realizada a necropsia. Durante a quarentena, existem protocolos que incluem tratamento com cobre de rotina durante 21 a 30 dias, com a mesma concentração de iões livres que em tratamento (0,15 a 0,2 mg/L), acompanhado de biopsias para diagnóstico (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Não existem, pois, métodos que eliminem por completo a possibilidade do parasita *A. ocellatum* se instalar numa exploração, nem medidas para o mesmo. Existem sim, vários métodos que isolados não causam impacto algum, mas que quando reunidos numa exploração, fazem a diferença entre a exploração se manter rentável ou abrir falência. Entre eles temos por exemplo renovação e filtração da água, lavagem e desinfecção de circuitos, lavagem de paredes dos tanques de rotina com escovas para remover o biofilme, realizar quarentena à chegada de peixes novos e vigilância do seu comportamento (14-21 dias), controlo da qualidade da água que entra nos tanques, banhos de pés, lavagens líquidas, separação física, formação a funcionários e a responsáveis, desinfecção de instrumentos de trabalho e pessoas entre muitos outros (Ramos & Oliveira, 2001; Soares *et al.*, 2011; Francis-Floyd & Floyd, 2011). Todos eles podem ser considerados em normas de bom manejo e seguimento de protocolo de biossegurança em explorações em que estes são recomendados em quaisquer tanques de peixes (Ramos & Oliveira, 2001), sejam estes de uma exploração, zoo marinho ou um aquário ornamental. Nunca esquecer que estas, por vezes, carecem de adaptações relativamente a(s) espécie(s) que se trabalham e ao tipo de tanque em que os animais se encontram. Estas boas práticas, para além de evitarem muitas infeções desnecessárias, podem atrasar outras que representariam um problema, permitindo uma decisão mais apropriada. Todas as decisões, assim como os dados dos animais (de onde vieram,

idade, espécie, etc) necessitam de estar devidamente identificados e registados para que se possa identificar o problema/fonte o mais brevemente possível (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Existem outros que podem ser questionados como por exemplo banhos de água doce de rotina por alguns minutos para desalojar possíveis trofontes mas estes são stressantes para o peixe (Ramos & Oliveira, 2001).

Em peixes de cultivo, existem variáveis como por exemplo a baixa variedade genética, densidade populacional, condições ambientais adversas, erros no manejo animal que podem potenciar a transmissão de parasitas, favorecer infeções e epizootias por parasitas (Soares *et al.* 2018).

Como já referido, a temperatura é uma variável importante no ciclo do parasita e pode ser uma ferramenta útil na tentativa de controlo do parasita, caso o peixe assim o permita. Apenas a 8°C é que o tomonete apresenta completa interrupção da divisão e morte ou a 35°C ou cima é que obtemos uma divisão deficiente, mas o dinósporo a 16°C perde quase por completo da sua capacidade de infeção, mas não significa que não mereça vigilância, especialmente se a temperatura do meio se alterar (Paperna, 1984).

Por observação, é do conhecimento geral que no caso de existirem sobreviventes em algumas espécies de peixes a um surto sub-letal ao parasita *A. ocellatum*, os mesmos desenvolvem imunidade mediada ao parasita por anticorpos específicos (Smith *et al.*, 1994; Cecchini *et al.*, 2001). Já existiram tentativas de criar vacinação contra o parasita, como o caso da tilápia azul (*Oreochromis aureus*) que adquiriu, com sucesso, anticorpos contra o parasita após inoculação de dinósporos fragmentados ou intactos, mas isso não é uma garantia de que o peixe não possa ser parasitado (Smith *et al.*, 1992; Soares *et al.* 2011).

As zonas em contacto com os tanques devem também ser vedadas/acesso exclusivo para funcionários e pessoas autorizadas, assim como equipamento restrito, isto porque, como já referido, se se suspeitar que o parasita possa ser transportado por fomites (roupa, redes mal lavadas e passadas de tanque para tanque, entre outros equipamentos de trabalho) ou vetores como aves marinhas pescadoras ou um cão que nade em diferentes zonas da exploração (com um peixe na boca ou não, quer este esteja vivo ou morto), entre outros animais e embora ainda não existam evidencias de que o parasita possa ser transportado (ex: no pelo de animal) e libertado em tanques diferentes, ou até propagado por aerossóis, no entanto, é fortemente recomendado que todos os fatores sejam tidos em conta a fim de evitar uma infeção que atualmente não possui um tratamento

eficaz e que pode pôr em causa a viabilidade de uma exploração. Caso um peixe de um tanque infetado seja transportado para um tanque não infetado, ou caso seja encontrado um peixe morto/moribundo num tanque, deve ser removido o mais cedo possível do tanque a fim de não permitir a propagação do parasita (Francis-Floyd & Floyd 2011). Dessa forma, é recomendado que áreas como a de quarentena devem encontrar-se separadas geograficamente das áreas restantes e com uma barreira física entre ambas e caso não exista, devem ser cobertas (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

A realização de limpezas de rotina também contribui para um tanque menos propício a infeções de *A. ocellatum*. Dependendo do tipo de tanque, os sistemas de limpeza devem ser adaptados e um bom exemplo é a limpeza dos fundos em tanques de interior a fim de remover possíveis tomontes, contribuindo assim para uma redução da carga parasitária, caso esta exista (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Como métodos físicos, uma das técnicas de prevenção passa pela utilização de um sistema de radiação UV à entrada da água, evitando assim a entrada de dinósporos por esta via, mas este método só seria praticável em sistema fechados como o caso de aquários de peixes decorativos (Soares *et al.*, 2011).

Em sistemas abertos, a prevenção só é possível através da monitorização cuidadosa da presença do parasita nos peixes durante períodos ótimos de crescimento e evitando situações de *stress* nos peixes, que desencadeie hipoxia e que possa conduzir a mortalidades em massa. Nestas situações em que é mais difícil de intervir e monitorizar, os procedimentos rotineiros de higiene, a organização dos materiais, as áreas de intervenção bem identificadas e restritas a pessoal da exploração, a rápida recolha e método de eliminação de peixes mortos, entre outras medidas, devem ser cumpridos (Soares *et al.*, 2011).

Os compostos contendo cobre são considerados perigosos para serem utilizados porque a margem de segurança é bastante baixa, ou seja, a margem entre a quantidade necessária para matar o parasita e a que é capaz de matar o peixe é pequena (Cardeilhac & Whitaker 1988), o que os tornam perigosos e apenas devem ser utilizados com acompanhamento e vigilância constantes por especialistas. Sendo o cobre tóxico para os peixes e letal para os invertebrados e não existindo um tratamento eficaz para *A. ocellatum*, é extremamente importante evitar a sua introdução numa instalação de aquacultura a todo o custo e para tal, requer uma estratégia eficaz, o mais completa possível e adaptada à exploração. As três vias mais prováveis/comuns pelas quais os parasitas são

introduzidos são por peixes infetados, águas e alimentos contaminados (Reed & Francis-Floyd, 1994).

A água do mar que venha com o peixe nunca deve ser inserida no tanque, pois pode ser uma fonte de novos agentes, entre eles, *A. ocellatum* e os peixes devem ser submetidos a um teste de PCR a fim de se descartar o mesmo (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Peixes que recuperem de um surto de *A. ocellatum* podem tornar-se imunes a este, o que é benéfico em caso de um novo surto, no entanto, isto não significa que não possam ter parasitas do mesmo modo, o que deve ser tido em conta caso a exploração tencione colocar novos peixes nesses tanques que possam causar um novo surto, o que deve ser evitado (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

1.4.4.3 Tratamento

Uma vez feito o diagnóstico, e no caso de ser positivo, é necessária uma intervenção rápida face ao parasita, numa luta contra o tempo, sem que isso comprometa o peixe, de forma a não causar prejuízo na produção (Ramos & Oliveira, 2001). Embora o dinósporo seja relativamente fácil de eliminar com quimioterapia quando comparado às duas outras fases do parasita que são muito mais resistentes, o que torna a erradicação do mesmo extremamente difícil (Lawler, 1980; Paperna, 1983; Ramos & Oliveira, 2001).

Quando um tanque (e apenas este) se encontra infetado pelo parasita, é crítico que a infeção se concentre apenas neste tanque, sendo imperativo que não se alastre, antes mesmo de iniciar o tratamento nesse mesmo tanque (Francis-Floyd & Floyd, 2011)

Métodos físicos

O tratamento deste parasita tem-se revelado difícil e inglório devido à tolerância e adaptação de intervalos de salinidade e temperatura, alargados por parte do mesmo, portanto, em parte, o tratamento passa muito por estender o tempo de vida do peixe, principalmente quando este se destina ao consumo (seja humano ou animal), a fim de atingir a idade/peso pretendido. Atualmente o alvo mais acessível são os dinósporos pois os tomontes e os trofontes têm-se revelado ser um problema, dada a sua grande tolerância, o que deixa este parasita sem um

tratamento completamente eficaz, apesar das inúmeras técnicas e métodos já testados (Lawler, 1980; Paperna, 1984; Soares *et al.* 2011; Francis-Floyd & Floyd, 2011; Sousa, 2014).

Por este parasita tolerar um intervalo tão amplo de temperatura e de salinidade, torna o controlo desta doença extremamente difícil pelo uso de parâmetros químicos e físicos (Paperna, 1984; Soares *et al.* 2011), especialmente se usados de forma isolada. As salinidades baixas não devem ser dadas como garantia de tratamento, isto porque, como já vimos, existem registos de casos em que o parasita foi identificado em peixes que habitavam ambientes selvagens com concentrações extremamente baixas como 2 a 3 ppt em peixes de ambientes estuarinos (Højgaard, 1962; (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Num ensaio experimental, tanto em secagens por sol como por incubadoras a 20-35°C, os tomontes sobreviventes falharam na sua divisão quando re-colocados novamente no regresso às condições ótimas de 40 ppt/20 °C, assim como em secagens com lavagem prévia de água corrente para excluir a hipótese da concentração de sal ou a cristalização durante o processo de secagem e mesmo assim não aliviou o efeito prejudicial da secagem dos tomontes (Paperna, 1984). Resumindo, através da manipulação da temperatura para 15°C ou inferiores, assim como diminuir a iluminação (Ramos & Oliveira, 2001), é possível inibir o crescimento do parasita, assim como o uso de salinidades reduzidas (Paperna, 1984; Soares *et al.*, 2011), mas não os neutraliza e há que ter em conta a tolerância da espécie de peixe em questão. Todos estes fatores podem aumentar a vida do peixe, mas caso estas variáveis voltem a ser ideais para o desenvolvimento do parasita, este retoma ao seu ciclo (Ramos & Oliveira, 2001).

Imersões em água doce têm-se demonstrado ser eficazes contra a fase livre do parasita (dinósporo), no entanto as fases enquistadas conseguem proteger-se, o que se traduz num tratamento pouco eficaz, caso se utilize apenas uma imersão. A sugestão por parte de alguns autores de diminuir a salinidade como método de controlar surtos tem aparentado ser duvidosa pois o parasita já se demonstrou capaz de florescer em ambientes salobros (Reed & Francis-Floyd, 1994), no entanto, há registos de casos em que o uso de água doce provoca a libertação da maioria dos trofontes das branquias (Kingsford, 1975; Soares *et al.*, 2011). Estas medidas são medidas que dificilmente seriam utilizadas em tanques de terra ou em peixes intolerantes, o que se traduz muito em não serem aplicadas de todo (Soares *et al.*, 2011).

Uma vez livres, os dinósporos são também um alvo possível de eliminar através de radiações UV (Ramos, & Oliveira, 2001) ou ozono (O₃), especialmente em sistemas de recirculação mas é apenas recomendado o uso por especialistas (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Métodos químicos

Os tratamentos, atualmente mais utilizados, são difíceis por serem intencionalmente longos a fim de permitirem que todos (ou pelo menos a grande maioria) os trofontes e tomontes formem dinósporos e por exigirem controlo periódico de reinfeção, pela limitação da sua aplicação quando o peixe se destina ao consumo humano, pela rápida e eficaz multiplicação por parte do parasita, pelo seu curto ciclo de vida, pelas suas infeções assíncronas e pela sua grande adaptação ambiental (Ramos & Oliveira, 2001). Na quimioterapia, os autores apresentam opiniões divergentes no que toca aos tratamentos comprovadamente eficazes. Reed e Francis-Floyd (1994) afirmam que são (1) o cobre (utilizado sob a forma de sulfato de cobre), (2) a cloroquina difosfato (também utilizado no tratamento contra a malária, sendo prejudicial a algas e invertebrados) que é eficaz no controlo de *A. ocellatum* em concentrações de 10mg/L com re-administração a cada 7-8 dias em peixes marinhos. Porém, só deve ser utilizado em peixes ornamentais ou de aquário e não pode ser utilizado legalmente em qualquer peixe destinado ao consumo humano ou classificado como peixe alimentar pela Food and Drug Administration (FDA) e a água carece de ser tratada com carvão ativado para remover resíduos químicos antes de ser mudada, a menos que falemos de sistemas de recirculação. Nesse caso o carvão deve ser removido durante tratamento com farmacos (Francis-Floyd & Floyd, 2011) e a cloroquina difosfato, apesar de matar rapidamente os dinósporos e de não ser toxica para os peixes a esta dosagem, é extremamente toxica para micro e macro algas, assim como para alguns invertebrados (Woo & Leatherland, 2006), (3) peróxido de hidrogénio que funciona a dosagens de 75-100 ppm e tem bastante sucesso em eliminar outros agentes patogénicos em alguns animais (como por exemplo *Mugil cephalus* e *Polydactylus sexfilis*) (Ramos & Oliveira, 2001) e com o *Amyloodinium* aparenta ter algum sucesso segundo Dee Montgomery-Brock (Montgomery-Brock *et al.*, 2001) com dosagens entre 75 e 150 mg/L (durante 30 minutos), onde todos os trofontes se libertam do hospedeiro, apesar de 24 horas depois voltarem e não é autorizado (pela FDA) a sua utilização no controlo de infeções bacterianas e parasitárias em peixes marinhas de água quente e (4) 3, N-metilglucamina lasalocida é capaz de inibir completamente o aparecimento de dinósporos em concentrações de 0,01 mg / l. Se usado a 0,10 mg / l por 24 horas pode reduzir a intensidade de infestação branquial em 80% ou até mesmo sem deixar quaisquer sinais de infestação se usado a 1 mg/l mas o custo-benefício dessas dosagens não foi discutido, apesar de ser encorajador (Woo e Leatherland, 2006). Por outro lado, Soares (2011) afirma que nenhum tratamento apresenta resultados satisfatórios à exceção do uso de cobre. O sulfato de cobre foi relatado pela primeira vez para uso terapêutico contra *A. ocellatum* por Dempster em 1955 (Francis-Floyd & Floyd, 2011) e tem-se demonstrado eficaz no combate contra

o parasita como método profilático/preventivo e, por esse motivo, tem sido usado como tratamento padrão durante anos. Contudo, apresenta efeitos secundários indesejáveis como toxicidade hepática e adstringente para o epitélio branquial (Souza, 2014) e carece de aprovação por parte da FDA, que ainda não se manifestou quanto à sua prática (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Os elasmobrânquios são também mais sensíveis que os teleósteos ao cobre. Os tomontes toleram concentrações de cobre 10 vezes mais elevada do que os níveis tóxicos para um dinósporo (Paperna, 1984; Soares *et al.*, 2011). Para além dos químicos referidos, encontramos o formaldeído e o ozono. O formaldeído (substância ativa do formol – 40%) em concentrações de 100-200 mg/l na água durante 6-9 horas, tem atuação nos trofontes, libertando-os do hospedeiro, embora não os mate ou remova do fundo do tanque, sendo também agressivo para as branquias dos peixes (Soares *et al.*, 2011). O ozono é uma molécula alternativa, instável, capaz de oxidar material orgânico de forma descontrolada e tem sido usado para higienizar/limpar a água de aquários e instalações de aquacultura com fins de minimizar concentrações de agentes infecciosos (fungos, bactérias, parasitas) dentro de água em situações que se justifiquem (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Há que ter em conta que qualquer tratamento químico carece de tempo suficiente para que possa ser eficaz, no entanto, deve ser acompanhado por um controlo apertado de testes em peixes para confirmar o sucesso do tratamento e adaptar a dosagem se necessário (Soares *et al.*, 2011). Apesar de o cobre ser o tratamento mais utilizado para o controlo de *A. ocellatum* devemos ter em conta que o utilizador deve conhecer os riscos da sua utilização. Apenas em sistemas de recirculação marinha, que não inclua invertebrados no seu sistema, o cobre é utilizado de forma gradual até este se encontrar numa concentração de 0,15- 0,20 mg/l de cobre livre (Cu^{2+}) durante vários dias (três semanas). Este método é considerado moderadamente eficaz, mas carece que a concentração se mantenha para assegurar que o *A. ocellatum* não possa causar mortes a peixes, pois a forma enquistada é resistente e capaz de manter a sua capacidade de infeção por pelo menos duas semanas, na ausência de um hospedeiro. Ao mesmo tempo, não se recomenda que sejam administradas grandes concentrações de uma dosagem só, para não atingir valores demasiado elevados para a sobrevivência dos peixes e dar, ao invés, mais vezes ao longo do tempo (Soares *et al.*, 2011). No uso deste tratamento, deve ter-se em conta que invertebrados não sobrevivem e alguns peixes toleram-no mal, como por exemplo tubarões e raias (Reed & Francis-Floyd, 1994). Por todos estes motivos, e também por ser extremamente tóxico para micro e macroalgas. O uso deste composto deve ser acompanhado de perto durante toda a sua utilização e ajustado se necessário (Woo & Leatherland, 2006). Até ao momento, nenhum composto de cobre foi aprovado pela FDA como uso de parasiticida em qualquer espécie aquática, antes incentiva a que os

produtores se mantenham informados sobre decisões futuras relativas a este tema (Reed & Francis-Floyd, 1994). Hoje em dia os tratamentos químicos são vistos como métodos eficazes (pelo menos o cobre é eficaz) mas também como uma alternativa de última escolha devido aos seus efeitos secundários e a questão da poluição do meio ambiente em situações em que se danifiquem tanques ou que estes apresentem alguma anomalia durante tratamentos, isto porque metais pesados podem induzir danos genotóxicos, direta ou indiretamente (Carella *et al.*, 2015a).

Já foram executados alguns estudos no uso de formalina como método de parasiticida contra dinósporos aprovado pela FDA, cuja eficácia já foi demonstrada. Não existe um período de segurança necessário quando utilizada em peixes destinados ao consumo humano. Em concentrações baixas como 25 mg/L, que é uma dose terapêutica comum, faz com que os trofontes caiam de peixes parasitados em poucas horas, embora não fiquem mortos. A não ser que os peixes sejam removidos do tanque, para um novo tanque não-infetado após o seu efeito, estes voltam posteriormente a ficar infetados (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

O peróxido de hidrogénio também foi aprovado pela FDA para uso em peixes com destino a consumo pelo Perox-Aid, uma solução que contém 35% de peróxido de hidrogênio. A formalina é também aprovada pela FDA para a sua utilização em peixes alimentares, no entanto, não é viável a sua prática pela toxicidade para o peixe (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Embora tenha sido pouco estudada, por ter sido uma descoberta accidental, aparentemente a carência de magnésio na água resulta em parasitas que não se dividem. Esta descoberta é interessante no caso das explorações começarem a possuir a sua própria água, produzida artificialmente por se acreditar que pode inibir a reprodução do Tomonte. Este tema carece de investigações mais profundas porque *in vitro* apresenta resultados interessantes, mas compromete a osmorregulação do peixe, tornando-o inviável em tanques de produção (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

O uso de anestésico MS-222 já se provou ser útil na separação de parasitas do hospedeiro, mas isso não significa que o *A. ocellatum* não se possa aderir novamente ou que tenha perdido capacidade de infeção. Caso seja utilizado este composto, deve ter-se em conta que, caso o peixe se destine a consumo humano, poderá haver lugar a algumas limitações de segurança. Nos EUA, a FDA exige um intervalo de segurança de vinte e um dias para peixes que tenham sido expostos a esta substância (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Métodos biológicos

Um método alternativo no controlo deste parasita seria o uso de um controlo biológico, como o uso de artémia (*Artemia* spp.) como predador de *A. ocellatum* na fase de dinósporo. A artémia é um pequeno crustáceo, de águas salgadas, com capacidade de filtração. Este método tem a vantagem de contribuir para a qualidade dos produtos de piscicultura, respeitando assim o Regulamento da Comunidade Europeia N° 710/2009, de Agosto de 2009, permitindo a certificação de produtos de aquacultura orgânica e evita os riscos dos usos da quimioterapia, como por exemplo sobredosagens ou efeitos tóxicos secundários dos tratamentos (mesmo respeitando as dosagens de referencia) (Soares *et al.*, 2011), no entanto, na prática, é inviável porque a artémia é uma presa para a maioria dos peixes, tornando o seu uso contra o parasita deficiente ou inviável (Oestmann *et al.*, 1995).

2 Objetivos

O parasita *A. ocellatum* causa elevada mortalidade em peixe produzido em aquacultura. Esta dissertação surgiu por interesse e necessidade de pesquisar este agente patogénico, de modo a encontrar uma forma de combater/controlar a sua propagação e as perdas que origina. Nesta dissertação, testa-se a utilização de ostras (*C. gigas*) enquanto organismo filtrador/depurador natural, premiando assim a produção multitrófica, com a utilização de ostras em policultivo com peixes.

Já é conhecido que a ostra filtra o parasita (Souza, 2014) e que esta sofre algumas lesões (inflamação, necrose, etc) mas não se apurou se a ostra recuperava após as 48 horas em contacto com o parasita e se fica capacitada para ultrapassar a fase-choque inicial desse contacto, assim como importa perceber que alterações sofre *A. ocellatum* após o contacto com a ostra e se este mantém a sua capacidade infetante. O tema tem portanto duplo interesse: 1 - saber se o parasita pode ser eliminado e/ou neutralizado na sua fase de dinósporo (fase de vida livre) através da filtração pela ostra, tendo em vista um interesse acrescido em aquacultura e zoos marinhos que muito sofrem com perdas nas suas populações piscícolas, que se refletem em perdas monetárias por via desta parasitismo e 2 – acredita-se que *A. ocellatum* é um parasita de peixes mas desconhece-se se consegue, igualmente, realizar o seu ciclo na ostra, se estamos perante um parasitismo errático ou se o parasita “atrasa o seu ciclo” quando filtrado pela ostra, conseguindo recuperar. Por outro lado, pretendemos avaliar se *A. ocellatum* tem capacidade de usar a ostra como vetor, podendo, dessa forma, disseminar-se por mais explorações e/ou tanques, representando assim um perigo para as explorações de aquacultura.

Neste trabalho foram utilizadas três metodologias:

A - Estudo histológico, destinado a observar possíveis lesões nos tecidos das ostras causadas pela presença do parasita, focando as branquias e tubo digestivo. O objetivo era avaliar a capacidade das ostras *C. gigas* filtrarem o parasita *A. ocellatum*. Foi observada a água do tanque ao microscópio ótico para avaliar se existia um decréscimo no número de parasitas. Foi ainda feita uma observação histológica dos vários tecidos (do trato digestivo e brânquias) das ostras de forma a avaliar a presença/ausência de parasitas nos mesmos e sinais de lesão que possam ter sido causados pelo mesmo e também uma observação e avaliação histológica das

lesões causadas a nível das brânquias e trato digestivo da ostra pelo parasita *A. ocellatum*, assim como a sua recuperação após exposição (observação histológica).

B – Identificação molecular do parasita para confirmação da presença do *A. ocellatum* no interior das ostras nos tecidos (tubo digestivo e brânquias) através de técnicas moleculares (identificação por PCR).

C – Observação de fezes sedimentadas, a análise das pseudo-fezes da ostra permite avaliar a presença e viabilidade do parasita após a digestão pela ostra pela capacidade de eclosão do parasita após filtração pela ostra (digestão), assim como a capacidade de neutralização do parasita na fase livre (dinósporo) por parte da ostra (recolha e observação da sedimentação de fezes).

3 Material e Métodos

3.1 Local de estudo

O estudo foi realizado na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do Instituto Português do Mar e Atmosfera (IPMA) - Av. do Parque Natural da Ria Formosa 8700-194 8700-225 Quelfes (Fig. 11). Localizada no distrito de Faro, no sul do País, a uma latitude de 37° 03' N e longitude de 07° 40' W.



Figura 11. Fotografia aérea da localização da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO)/ Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) disponibilizada pelo IPMA

3.2 Material biológico

Foram recolhidas 80 ostras (*Crassostrea gigas*) de um dos tanques de terra de 2500 m³ (Fig. 12) produzidas em policultura com peixes (corvinas (*Argyrosomus regius*), sargos-legítimos (*Diplodus sargus*), tainhas (*Mugil cephalus*)) na EPPO.

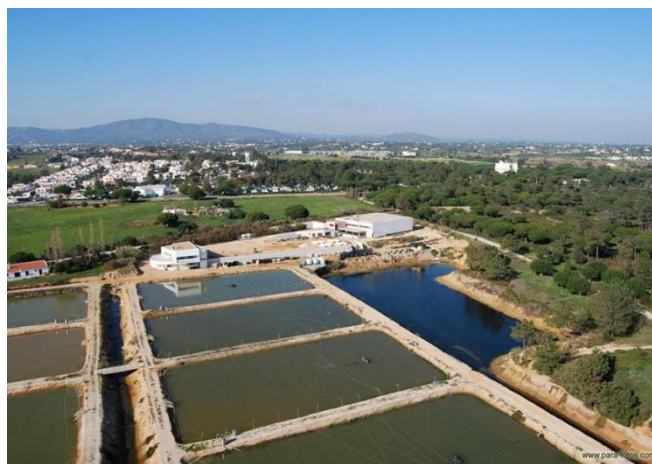


Figura 12. Fotografia aérea dos tanques de terra de onde foram recolhidas as ostras utilizadas neste estudo da EPPO/ IPMA. Fotografia disponibilizada pelo IPMA

3.3 Desenho experimental

Após amostragem do peso e largura total, as ostras foram divididas em dois grupos de 40 ostras. Num dos grupos (grupo infetado) foram colocadas as ostras em contacto com o parasita (*A. ocellatum*) a fim de se observar se a ostra, enquanto filtrador, consegue eliminar o parasita ou, ao invés, e se, no caso de ocorrer filtração, o parasita é capaz de manter as suas capacidades infetantes. O outro grupo (grupo controlo) foi mantido em cultivo normal, nas mesmas condições, mas sem a presença do parasita.

3.4 Procedimento

Ensaio A- Infeção das ostras com *Amylodinium ocellatum*

Foram criadas duas condições de cultivo (Fig. 13), um tanque controlo e outro tanque infetado. Os tanques tinham uma capacidade de 75 L de volume total, onde foram colocadas 40 ostras em água salgada. Diariamente foram adicionados 2,5 L, durante 4 dias, de duas espécies de microalgas (*Phaeodactylum tricornutum* e *Skeletonema costatum*), ambas diatomáceas, /2,5 L de cada uma em cada tanque, produzidas nas instalações da EPPO, para alimentação das ostras. No decurso da observação que estabelecemos em quatro dias (sendo representado neste ensaio com T0-T96 que significa que foi iniciado com o começo do ensaio e durou 4 dias, ou seja, 96 horas), procedemos à vigilância das ostras, para garantirmos que estas dispunham de alimento, sistema de oxigenação, com a temperatura $21\pm1^{\circ}\text{C}$ e iluminação artificial constantes. Durante o ensaio, a temperatura, a concentração de oxigénio e a sua saturação foram medidos a cada 24 horas com um oxímetro portátil do modelo SINERGIA. As ostras recolhidas do tanque de terra para o uso neste

ensaio foram medidas (Fig.14) e pesadas para criarmos 2 grupos homogêneos, de maneira a não influenciar os resultados.

O ensaio teve início 24 horas após a introdução das ostras nos tanques, para aclimação das mesmas. No tanque infetado foram colocados 1000 dinósporos/ml e foi mantida esta concentração durante 5 dias. Para tal foram efetuadas contagens diárias do número de dinósporos no tanque infetado. A concentração de dinósporos no tanque infetado foi verificada com um microscópio NIKON ECLIPSE Ci H550S.

Foram feitas amostragens às 2 horas (T2), 4 horas (T4), 8 horas (T8), 24 horas (T24), 48 horas (T48) e 120 horas (T120) (5 dias). Nestes pontos de amostragem foram recolhidas três ostras do tanque controlo e 3 ostras do tanque infetado (Fig. 13) e observada e registada a evolução da cor dos tanques, causada pela capacidade de filtração das microalgas por parte das ostras e comparação entre ambos.

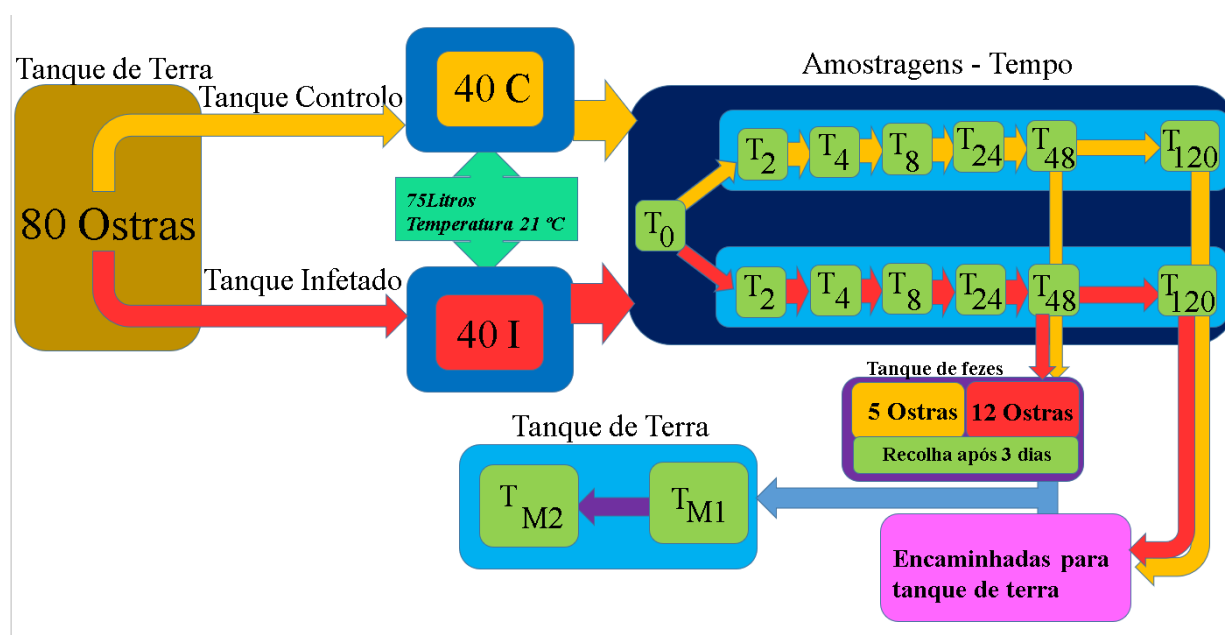


Figura 13 - Fluxograma do ensaio experimental – As etapas das ostras *Crassostrea gigas* ao longo do ensaio. “40 C” significa 40 ostras do grupo controlo; “40 I” significa 40 ostras do grupo infetado, “T” é a unidade tempo, representando “horas após o início do ensaio”; “TM” é a unidade tempo, representado “meses após o início do ensaio”

Ensaio B- Depuração das ostras (*Crassostrea gigas*) após infecção com *Amylodinium ocellatum*

Após o período de infecção (5 dias), as ostras foram recolhidas e transportadas para os tanques de terra, onde ficaram em sacos separados (tanque controlo e tanque infetado), vigiadas e avaliadas 2 vezes por semana, para aferir a mortalidade. Ao fim de 1 mês (M1) e de 2 meses (M2) após o final do ensaio de infecção, foram amostradas três ostras de controlo e três ostras infetadas, para análise histológica.



Figura 14. Comprimento máximo (tracejado vermelho) registado para a biometria das ostras (*Crassostrea gigas*). Foto disponibilidade pelo IPMA e adaptada

Durante o ensaio e em cada ponto de amostragem foram recolhidas amostras de ostras para histologia e no T48 foram também recolhidas ostras para biologia molecular.

3.5 Análises laboratoriais

3.5.1 Histologia

Em todos os pontos de amostragem foram recolhidas amostras para histologia (3 ostras do tanque controlo e 3 ostras do tanque infetado) que foram fixadas em solução de Davidson (Anexo II) durante 48 horas e posteriormente colocadas em álcool 70% e devidamente identificadas. As amostras foram preservadas no frigorífico a uma temperatura de 4°C, até processamento. Após identificação, as amostras de ostra, foram colocadas em cassetes e colocadas no processador de tecidos para desidratação, passando por várias soluções de etanol em concentrações crescentes, com a finalidade de desidratar os tecidos, posteriormente por xilol e finalmente imersas em parafina. O equipamento utilizado para fazer os blocos foi uma consola LEICA EG 1140C. Posteriormente os blocos foram preservados no frigorífico até serem efetuados os cortes de 5 micrometros de espessura no micrótomo (micrótomo LEICA RM 2155), que foram secos numa estufa durante pelo menos 4 a 5 horas a 24°C. Os cortes foram, posteriormente, corados com hematoxilina-eosina (Anexo III) e montadas com DPX (da marca Merck) e lamela. Antes da observação ao microscópio as lâminas foram cuidadosamente limpas. No final, os cortes foram digitalizados no NANOZOOMER HAMAMATSU PHOTONICS e posteriormente analisados.

Com os cortes histológicos efetuados procedeu-se a 2 avaliações distintas.

(A) Biométrica, foi determinada a área, perímetro e circularidade ($4\pi \times \text{área}/\text{perímetro}^2$), para avaliar o lúmen tubular do trato intestinal (Fig.15) com recurso ao programa *imagej* (versão 1.52a).

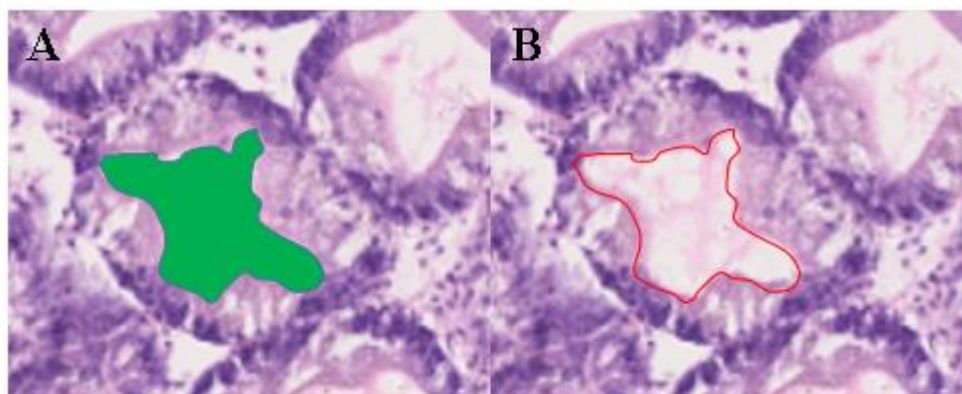


Figura 15. Fotografia utilizada no programa *Imagej* para obtenção da área (A), perímetro e circularidade (B) do lúmen do intestino da ostra *Crassostrea gigas*.

As imagens de histologia foram observadas e avaliadas. A partir do programa *Imagej* que permite determinar a área, perímetro e circularidade dos lumens observados. Durante a

recolha de imagens para posterior avaliação, foram selecionadas 10 imagens de cada ostra que continham pelo menos 10 seções do lúmen (obtendo assim, pelo menos 100 seções lumens por ostra), a fim de premiar as zonas mais concentradas e obter uma amostragem equilibrada. Após a seleção das imagens, procedeu-se à manipulação das mesmas de modo a medir a área, perímetro e circularidade. Para cada imagem selecionada, realizou-se a média dos valores recolhidos (para cada ostra) para a área, o perímetro e a circularidade. Este procedimento foi repetido para todas as etapas do ensaio, desde T0 a TM2.

Nota: A circularidade é uma medida circular que pode ir de 0 a 1 e avalia a perfeição do círculo, onde 1 significa que o círculo é perfeito.

(B) Celular, onde foi determinado a intensidade e dispersão das lesões detetadas.

Foram recolhidas imagens com uma ampliação de 100x e a área foi selecionada manualmente para evitar erros nos resultados devido a falsos positivos durante a avaliação da área do lúmen do intestino. Foi também avaliada a intensidade e a dispersão das lesões, num sistema de pontuação, para possibilitar a sua classificação.

A classificação das lesões foi efetuada com base no seguinte:

Para as Brânquias: (1) Hiperplasia Epitelial; (2) Hiperplasia das células de muco; (3) Hiperplasia das células granulares; (4) Infiltração de hemócitos; (5) Necrose e (6) Erosão

Para o Trato Digestivo: (1) Hemócitos (Infiltração/diapedese); (2) Hemócitos (agregados); (3) Enterite; (4) Fusão lamelar; (5) Regressão tubular; (6) Necrose e (7) Erosão para lâminas de Trato Digestivo.

Todos os resultados foram tabelados de 0 a 5 relativamente à presença onde:

0 representa que a mesma não foi encontrada na amostra (0%);

3 foi identificada em 60% da amostra;

5 foi identificada em 100% da amostra.

Relativamente à intensidade de uma lesão, onde:

0 representa que a mesma foi nula

1 encontrada de forma suave/discreta

- 2 encontrada de forma visível
- 3 encontrada de forma evidente
- 4 encontrada de forma muito evidente
- 5 extremamente evidente

À semelhança do que se realizou com a avaliação biométrica (A), também foi realizada uma média entre os valores registados em cada ponto de amostragem (T0 a TM2).

3.5.2 Biologia Molecular

As amostras para biologia molecular, destinadas à identificação do parasita por PCR, foram recolhidas às 48 horas (T48) e conservadas em etanol 70% até processamento futuro.

Previamente à extração de ADN foram dissecadas as regiões das branquias e do trato digestivo da ostra e colocadas dentro de tubos de 2ml, contendo esferas de cerâmica, sílica e vidro (de diâmetros variáveis) incluídos no kit de extração utilizado (FastDNA™ Spin Kit for Soil da MP Biomedicals). A homogeneização dos tecidos foi efetuada no Tissue lizer da Qiagen durante 40 segundos a uma frequência de 30 rotações/seg. A ação mecânica deste equipamento permite destruir a barreira quística do parasita e expor o ADN do mesmo, permitindo a sua extração. Este passo foi repetido porque uma das amostras apresentava ainda vestígios de tecido íntegro. A extração e purificação das amostras foram realizadas segundo as instruções do fornecedor (Anexo IV).

Com o objetivo de amplificar o ADN que se encontra na amostra, realizou-se a técnica de PCR. Esta técnica vai-nos permitir amplificar a zona de interesse do ADN previamente selecionada, como esquematizado na Figura 16. Os primers utilizados já foram utilizados com sucesso na amplificação de *A. ocellatum* (Marques *et al.*, 2019).

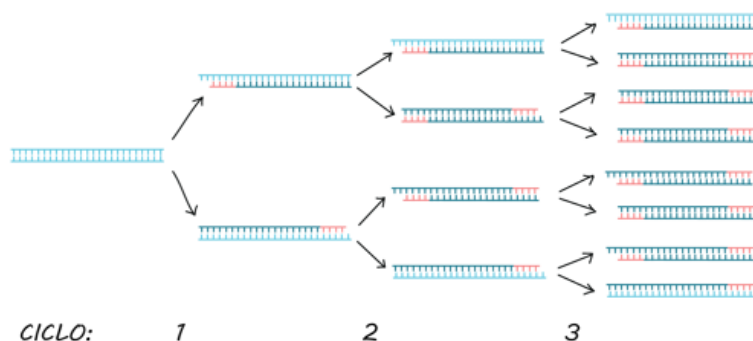


Figura 16 – Esquema exemplificativo dos ciclos do PCR (Polymerase Chain Reaction/Reação em Cadeia da Polimerase). Imagem adaptada de Khan Academy em Métodos de análise do ADN.

A reação PCR foi realizada em tubos de 200 microlitros onde foram colocados os reagentes listados na Tabela I. Antes de utilizar os reagentes, estes sofreram um processo de centrifugação ligeira (spin) para garantir que se mantinham no fundo.

Tabela I. Reagentes adicionados aos tubos de PCR.

Reagentes	Quantidade
H ₂ O	32,3 µL
10x PCR buffer	5 µL
Mg Cl ₂ (50mM)	1,5 µL
dNTPs mix (1mM)	1 µL
Primer Fw (10mM)	2,5 µL
Primer Rv (10mM)	2,5 µL
ADN	5 µL

Após colocação da enzima (polimerase) e do ADN, as amostras foram agitadas no vortex e realizou-se um novo spin. Iniciámos o procedimento à temperatura 94°C por 3 minutos para desnaturação da cadeia dupla de ADN, seguindo-se 35 ciclos entre as temperaturas (1) 95°C por 45 segundos para a desnaturação, (2) 55 °C por 30 segundos para emparelhamento dos primers e (3) 72°C por 45 segundos para extensão. Por último, foi realizado um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos (Fig. 17). Após o término da reação a amostra foi preservada a -20°C até nova utilização.

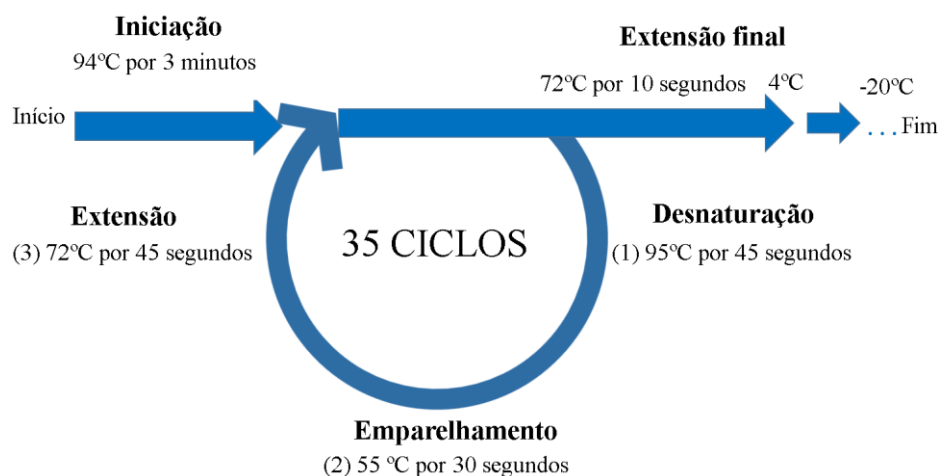


Figura 17. Fluxograma simplificado das várias etapas realizadas em PCR: desnaturação, annealing e extensão

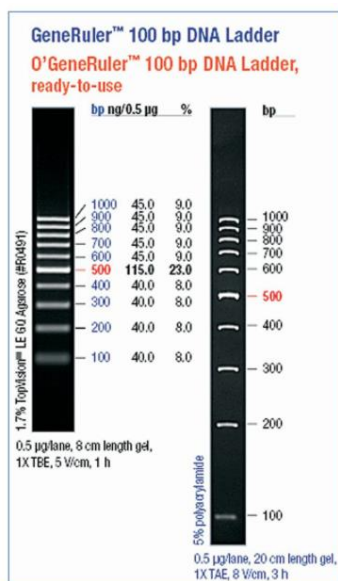


Figura 18. Imagem padrão de fragmentos de marcador (100 bp). Fonte: Thermo Scientific

Para observação dos fragmentos amplificados na reação PCR, realizou-se uma eletroforese em suporte horizontal. Assim, correram-se as amostras num gel de agarose (1,5%), que foi dissolvido em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), a mesma solução que foi utilizada como tampão de corrida. Para derreter a agarose a solução foi colocada no micro-ondas durante, aproximadamente, 1 minuto, com intervalos de 20 em 20 segundos para voltar a agitar a solução e promover a homogeneidade. Foi, posteriormente, colocada num suporte com um pente para criar os poços, onde solidificou. As amostras foram preparadas com uma solução de tampão de corrida que lhes confere cor e densidade.

Juntamente com um controlo positivo da casa (um fragmento de uma amostra de ADN extraído de tomentos de *A. ocellatum*, amplificado com os mesmos primers) e um marcador de massa molecular. As amostras foram postas a correr no gel, para permitir assim a observação e interpretação seguindo o padrão (Fig. 18). O marcador de massa molecular possui vários fragmentos de ADN com tamanhos conhecidos, o que nos permite, por comparação, saber qual a massa molecular da nossa amostra. O controlo positivo serve como indicador de que a técnica foi realizada corretamente.

Como procedimento normal nas identificações moleculares, as amostras foram enviadas para sequenciação, neste caso, na plataforma de sequenciação do Centro de Ciências do Mar, com o analisador genético da Applied Biosystem 3130xl, a fim de confirmarmos que foi ampliado somente ADN de *A. ocellatum*.

3.5.3 Viabilidade dos dinósporos após filtração pelas ostras

Recolha de fezes: Após 48 horas do início do ensaio, recolheram-se 12 ostras (tanque infetado) e 5 ostras (tanque controlo) colocaram-se separadamente para produção de fezes durante 3 dias, num recipiente, com 10 L de água salgada e arejamento constante. Dessas ostras, e após os 3 dias, foram recolhidas 3 ostras de cada tratamento para histologia, de acordo com o procedimento anteriormente descrito. As ostras restantes foram encaminhadas para o tanque de terra,

juntamente com as ostras do ensaio inicial. Ao fim de 3 dias as fezes foram recolhidas com um aspirador e concentradas em tubos de 50 ml, preservadas no frigorífico e observadas no dia seguinte.

Ensaio para eclosão de dinósporos: Com o objetivo de verificar se os dinósporos de *A. ocellatum* permaneciam viáveis após a passagem pelo trato digestivo das ostras foi induzida laboratorialmente a sua eclosão de acordo com o protocolo de Moreira *et al.* (*comunicação pessoal*). Assim, as fezes das ostras foram colocadas com uma solução-mãe constituída de uma mistura de antibiótico (streptomicina+penicilina numa proporção de 400:400 com a água salgada do tanque homogeneizada), água salgada da lavagem de brânquias de corvina filtrada (com um filtro de 0,45 µm). As amostras de fezes foram colocadas numa placa de 24 poços numa estufa (WTG Binder) a 22° C para criar as condições ideais para que os dinósporos eclodissem. As amostras foram observadas ao microscópio ótico, a cada 24 horas, durante 5 dias para contagem dos dinósporos. Realizaram-se meios de cultura em triplicado para cada amostra de Controlo Experimental (C) e Infetado (I), assim como para Controlo Positivo (C+) e Controlo Negativo (C-), como apresentado na Figura 19.

Na preparação do C+ colocou-se uma amostra positiva de *A. ocellatum* (20 µl) já existente, pertencente ao IPMA, juntamente com cerca de 2 ml de água filtrada, de um tanque interior com Sargos-legítimos (*Diplodus sargus*), em cada poço.

Na preparação do C- colocou-se água filtrada (2ml), de um tanque interior com Sargos-legítimos, em cada poço.

Na composição de I, colocou-se 0,5 ml de água de suspensão das fezes/pseudofezes e 1,5 ml de água filtrada de um tanque interior com Sargos-legítimos, em cada poço.

Na composição de C, colocou-se 1 ml de água de suspensão das fezes/pseudofezes de ostra (do grupo controlo), juntamente com 1ml de água do mesmo tanque para cada poço.

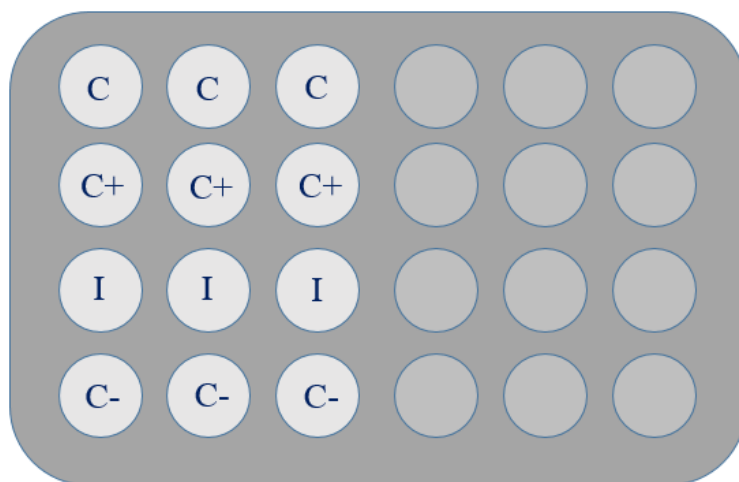


Figura 19. Esquema da organização das amostras de sedimentação de fezes no suporte de poços de cultura.
C - Controlo Experimental; I -Infetado Experimental; C- - Controlo Negativo; C+ - Controlo Positivo

Para a contagem dos dinósporos eclodidos das amostras de cada grupo (C, I, C- e C+), foi colocada 1 gota na câmara de Bürker onde foi realizada a contagem dos dinósporos. Foram realizadas 3 amostragens (contagens) para cada poço, obtendo assim 9 amostras de cada grupo. O volume da câmara de Bürker contido em cada quadrado é de $12\,00025\text{ mm}^3$ ($0,0025\text{ mm}^2 \times 0,1\text{ mm}^2$), logo em 40 quadrados o volume será de $0,01\text{ mm}^3$.

3.6 Análise estatística

A fim de determinar o impacto do parasita na população de ostras infectadas, comparativamente à população de controlo, foi utilizada a técnica ANOVA 1-way para aferir se a presença do parasita *A. ocellatum* é significativa no desenvolvimento de lesões nas ostras. Os cálculos foram realizados com uma extensão do programa Excel do Microsoft Office Professional Plus 2013. A variável é o tempo (eixo de X) e a pontuação da intensidade/dispersão das lesões foi pontuada de 1 a 5 (eixo de Y).

- Se $P \text{ value} > 0.05$. Existem fortes evidencias contra a Hipótese alternativa (Apoia a Hipótese nula)
- Se $P \text{ value} < 0.05$. Existem fortes evidencias contra a hipótese nula (Apoia a Hipótese alternativa)

- Hipótese alternativa: a presença do parasita *A. ocellatum* teve um impacto decisivo no desenvolvimento de lesões na ostra

- Hipótese nula: a presença do parasita *A. ocellatum* não apresenta influência notória no desenvolvimento de lesões na ostra

O fator é significativo quando o valor de F é superior ao valor de F crítico e quando o valor de P (P value) é inferior ao valor de referência (0,05). Neste caso, o fator é o impacto do parasita.

4 Resultados

4.1 Dados biológicos

A medição e a pesagem das ostras foram realizadas com o intuito de tentar ter duas populações (controlo e infetado) o mais homogéneo possível. Como se pode verificar pela Tabela II, obtivemos no início do ensaio, no controlo um peso médio de $15,9 \pm 5,0$ g e um comprimento médio de $5,4 \pm 0,6$ cm e nas ostras infetadas um peso médio de $17,5 \pm 5,5$ g e um comprimento médio de $5,7 \pm 0,45$ cm.

4.2 Parâmetros de qualidade da água

Durante o ensaio experimental, realizou-se um controlo diário do oxigénio dissolvido e da temperatura, a fim de oferecer as mesmas condições a ambas populações estudadas. Os valores recolhidos foram organizados na Tabela II.

Tabela II. Valores dos parâmetros físico-químicos registados (temperatura, oxigénio dissolvido, % de saturação do oxigénio) durante o ensaio experimental. T é a unidade tempo significando horas após o início do ensaio

Tempos	Horas	Controlo			Infetado		
		O ₂ (mg/L)	Saturação (%) de O ₂	Temp. (°C)	O ₂ (mg/L)	Saturação (%) de O ₂	Temp.(°C)
T2	12:40	6,6	92	21,8	6,2	86	21,8
T24	12:10	6,5	87	20,3	6,1	83	20,7
T48	13:15	6,6	90	20,4	6,6	89	20,6
T120	11:30	6,8	93	20,2	6,7	90	20,1

4.3- Observação da filtração das ostras *Crassostrea gigas* em ambos os tratamentos (controlo e infetado)

As observações da turbidez da água ao longo da experiência deixaram claro que existia um desempenho distinto entre as ostras que se encontravam no grupo infetado e as ostras do grupo controlo. A filtração por parte das ostras do grupo controlo foi mais eficaz e rápida,

comparativamente às ostras do grupo infetado, como demonstra a Figura 20, tendo, ambas, recebido a mesma concentração de microalgas, ao mesmo tempo.

Para a avaliação do efeito do parasita na ostra foram realizadas técnicas de laboratório (histologia e biologia molecular). Os resultados foram distintos conforme a técnica usada.

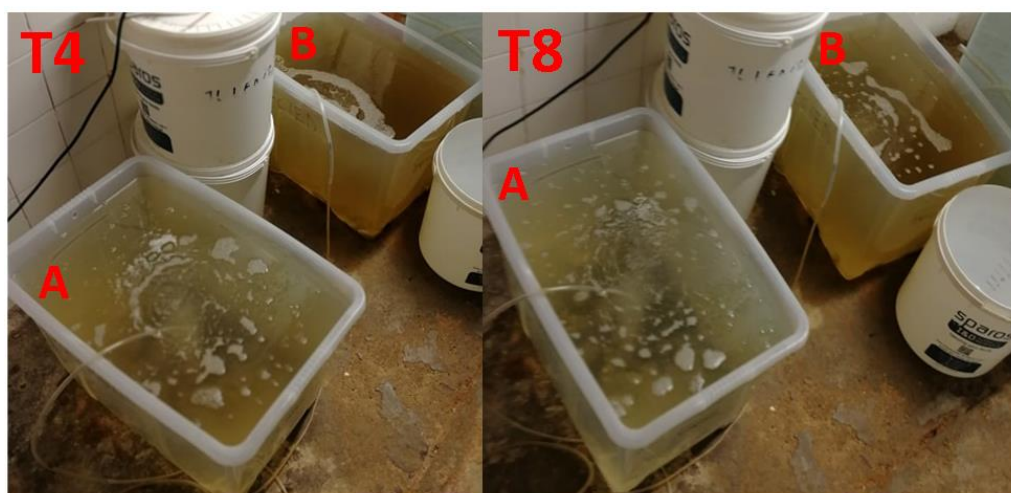


Figura 20. Fotografias demonstrativas da evolução da cor do tanque do grupo controlo e infetado após adição do alimento T4 (4 horas após o início do ensaio) e T8 (8 horas após o início do ensaio). Tanque A- Controlo, Tanque B- Infetado.

Como referido no procedimento, as observações realizadas nos tanques ao longo da experiência foram acompanhando a evolução dos dois tanques e as diferenças começaram-se a fazer notar a partir do T4 (4 horas após o início do ensaio), como observado na Figura 20 (T4 e T8). Em T8 (Fig. 21) as diferenças entre ambos eram evidentes quanto à diminuição da capacidade de filtração das ostras do grupo infetado e que se manteve pelo resto do ensaio, não apresentando alterações significativas após atingir o estado de T48 (Fig. 22).

Ao fim do 3º dia (T72) observou-se que a filtração das ostras no tanque de controlo já não era a mesma, levando a acreditar que se tinha alcançado uma saturação por parte da ostra. No entanto, o suplemento alimentar diário foi mantido em ambos os tanques até ao fim (T120). As ostras dos infetados, apresentavam uma filtração mínima, mas constante ao longo destes 3 dias. Ao 4º dia (T96), ambos os tanques aparentavam não estar a realizar depuração/filtração.

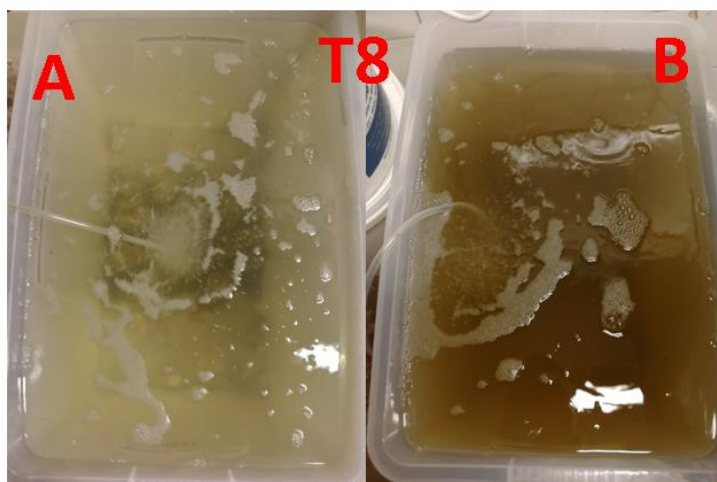


Figura 21. Fotografia comparativa de ambos os tanques no ponto T8 (8 horas após início do ensaio). A – Controlo e B – Infetado



Figura 22. Fotografia comparativa de ambos os tanques no ponto T48 (48 horas após início do ensaio). A – Controlo e B – infetado

4.4 Análise histológica

4.4.1 Avaliação do lúmen tubular do trato intestinal das ostras (*Crassostrea gigas*)

Na sequência da análise das imagens, no programa *Imagej*, as imagens foram trabalhadas a partir das originais, como demonstrado na Figura 23 (A1 e B1) que foram revertidas para preto e branco (A2 e B2) e posteriormente invertidas a cor para a sua avaliação (A3 e B3). Verificou-se que a média (de T0 a T120) da área do lúmen das ostras do controlo é de $1743,5 \pm 207,9 \mu\text{m}^2$ e nas ostras do grupo infetado $1571,6 \pm 349,9 \mu\text{m}^2$. De uma maneira geral, as ostras pertencentes ao grupo infetado tiveram uma área do lúmen inferior às ostras do grupo controlo, sendo que T8 (Gráfico 1) este valor é mais acentuado, apresentando $1919 \pm 218,24 \mu\text{m}^2$ (controlo) comparativamente a $1313,9 \pm 196,5 \mu\text{m}^2$ (infetados). Relativamente ao perímetro do

lúmen do trato digestivo, as médias (de T0 a T120) foram de $206,0 \pm 18,2 \mu\text{m}$ no controlo e $213,4 \pm 28,7 \mu\text{m}$ nos infetados, revelando que o valor do perímetro é tendencialmente mais alto nas ostras do grupo infetado, embora não significativamente. Quanto à circularidade (Gráfico 3), as médias (de T0 a T120) foram de 0,52 (controlo) e 0,57 (infetado) e o valor T24 apresentou uma divergência de 0,44 (controlo) para o 0,58 (infetados), sendo que não houve uma alteração significativa entre o grupo controlo e infetado. Em nenhum dos parâmetros (área, perímetro e circularidade) existiu um distanciamento significativo ou relevante de referência durante todo o ensaio, como observado nos Gráficos 1, 2 e 3.

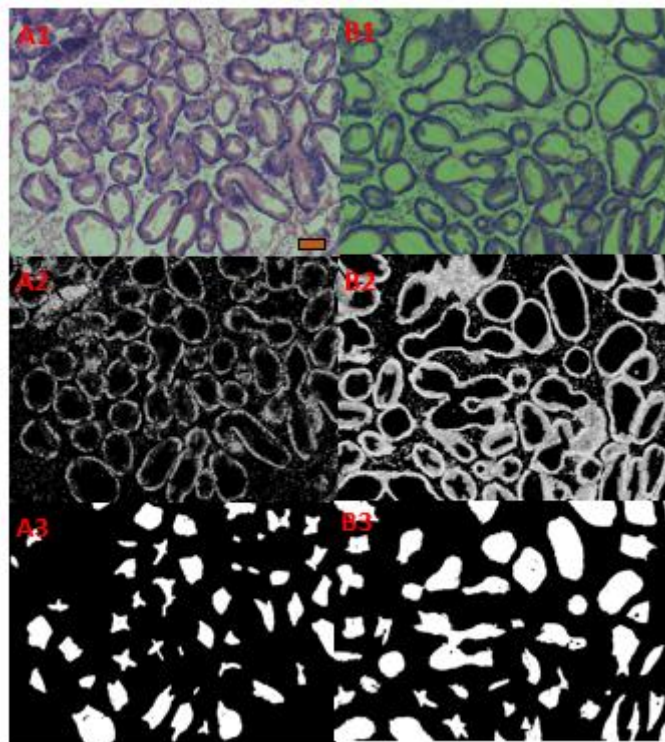


Figura 23. Transformação das imagens para o uso de *imagej* para avaliação da área, do perímetro e circularidade do lúmen do trato digestivo das ostras (*Crassostrea gigas*). A1/A2/A3 – imagem da ostra controlo T8 e B1/B2/B3 – imagem da ostra infetados T8 e a transformação das respetivas imagens. Escala: 250 μm e ampliação 100x

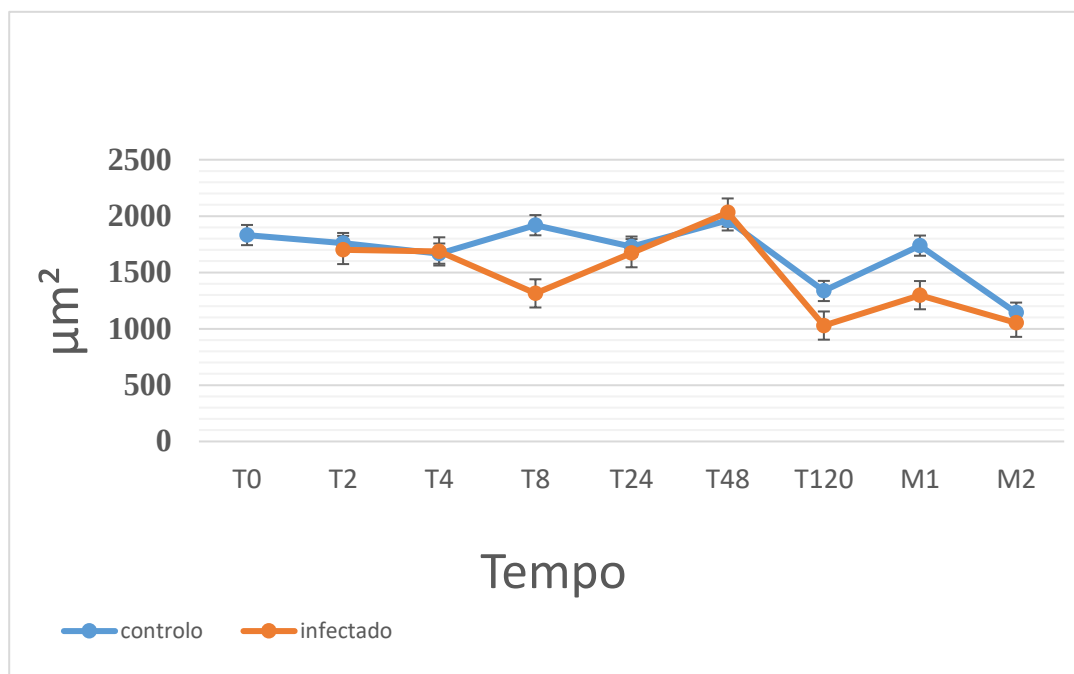


Gráfico 1. Valores médios da área do lúmen tubular do trato digestivo da ostra *Crassostrea gigas* durante o ensaio. As barras de erro representam o desvio padrão.

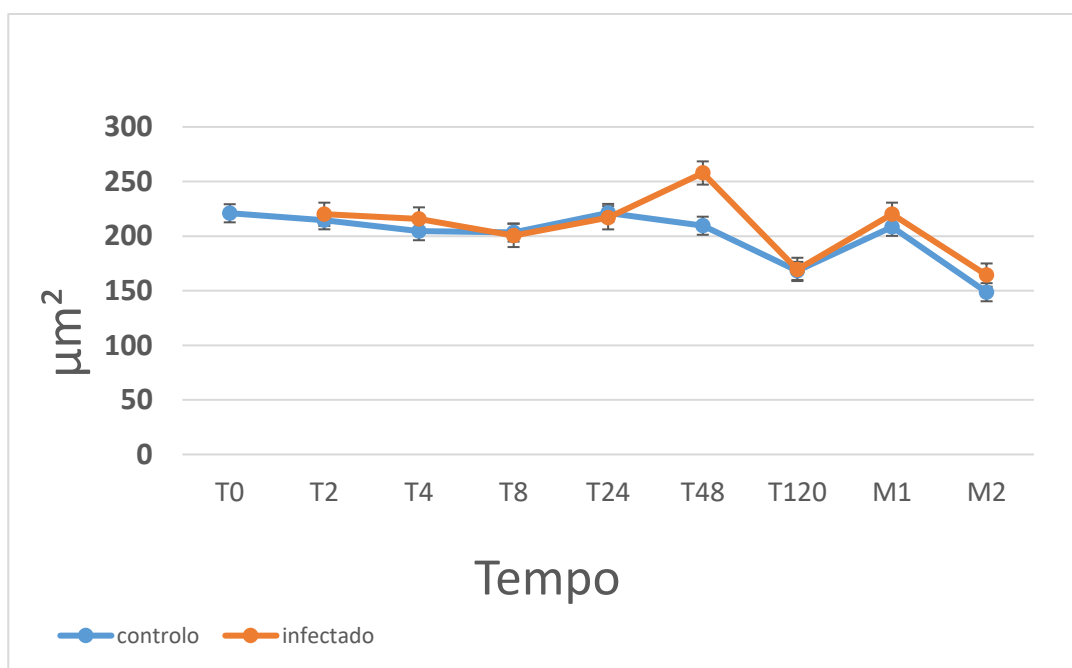


Gráfico 2. Valores médios do perímetro do lúmen tubular do trato digestivo da ostra *Crassostrea gigas* durante o ensaio. As barras de erro representam o desvio padrão

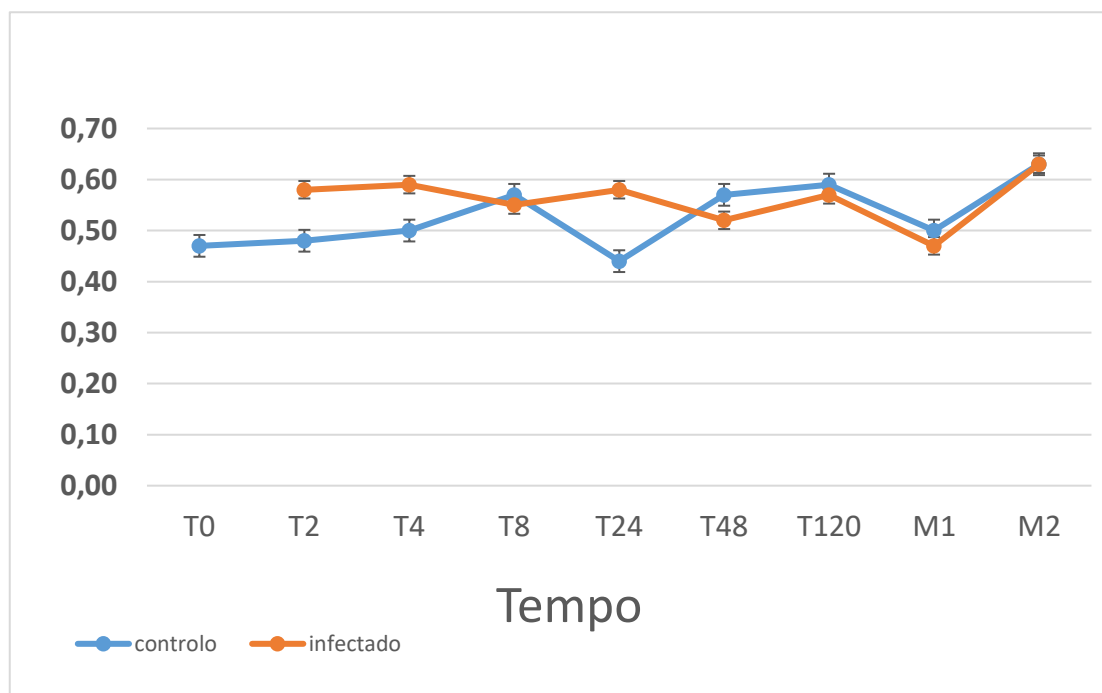


Gráfico 3. Valores médios da circularidade do lúmen tubular do trato digestivo da ostra *Crassostrea gigas* durante o ensaio. As barras de erro representam o desvio padrão

Tabela II. Média e desvio padrão dos valores da área, perímetro e circularidade do lumen tubular das ostras (*Crassostrea gigas*) utilizadas no ensaio de cada tempo. Foi identificado com “*” os resultados dos grupos controle e infectados que sobressaíram

	Área (µm²)		Perímetro (µm)		Circularidade	
Tempo	Controlo	Infetado	Controlo	Infetado	Controlo	Infetado
T0	1831,6±312,8		220,9±16,3		0,47±0,01	
T2	1760,6±904,8	1699,1±278,6	214,5±81,2	220,0±27,2	0,48±0,1	0,58±0,03
T4	1666,9±385,1	1686,5±579,9	204,5±36	215,7±47,6	0,50±0,05	0,59±0,06
T8	1919,0±218,2*	1313,9±196,6*	203,3±19,6	200,6±8,4	0,57±0,08	0,55±0,01
T24	1728,8±0	1670,6±351,3	221,2±0	216,8±26,2	0,44±0*	0,58±0,05*
T48	1962,0±168	2031,3±718,6	209,5±36,5*	257,8±78,8*	0,57±0,14	0,52±0,1
Período de Recuperação						
T120	1335,4±862,6	1028,4±345,9	168,1±64,9	169,5±36,1	0,59±0,05	0,57±0,08
M1	1737,6±222*	1298,1±146,2*	208,5±21,9	220,0±41	0,50±0,02	0,47±0,1
M2	1142,7±320,8	1053,3±508	148,6±26,8	164,3±32,7	0,63±0,07	0,63±0,05

Conforme apresentado na Tabela III, no grupo controlo e infectado as ostras não apresentam diferenças significativas no final da exposição T120, com uma média de perímetro do

lúmen de $168,1 \pm 64,9 \mu\text{m}$ e $169,5 \pm 36,1 \mu\text{m}$ respetivamente. À semelhança do que aconteceu com a área e a circularidade onde as diferenças também não foram significativas.

Destaca-se somente as diferenças significativas observados para a circularidade em T24 em que o grupo controlo teve uma circularidade de 0,4 e o grupo infetados 0,6. Também para a área do lúmen se destacam os valores do T8, onde o grupo controlo tem valores significativamente superiores ao grupo infetado, $1919,0 \pm 218,2 \mu\text{m}^2$ e $1313,9 \pm 196,6 \mu\text{m}^2$, respetivamente. Para o caso do perímetro os valores mais elevados e significativamente diferentes são observados no T48 atingindo o grupo infetado $257,8 \pm 78,8 \mu\text{m}$.

4.4.2 Identificação e classificação das lesões nas brânquias e trato digestivo das ostras

Tal como referido no material e métodos, a classificação das lesões foi efetuada com base numa escala de 1 a 5 em Intensidade e Dispersão, onde o valor 1 representa pouco/suave e o valor 5 muito/evidente. As Tabelas e Gráficos realizados sobre estas classificações encontram-se presentes nos Anexo V e VI.

Nas Figuras 24, 25 e 26 podemos observar algumas imagens de preparações histológicas coradas com Hematoxilina/Eosina, do trato digestivo e brânquias, que foram avaliadas quanto às lesões apresentadas, de acordo com a escala referida anteriormente.

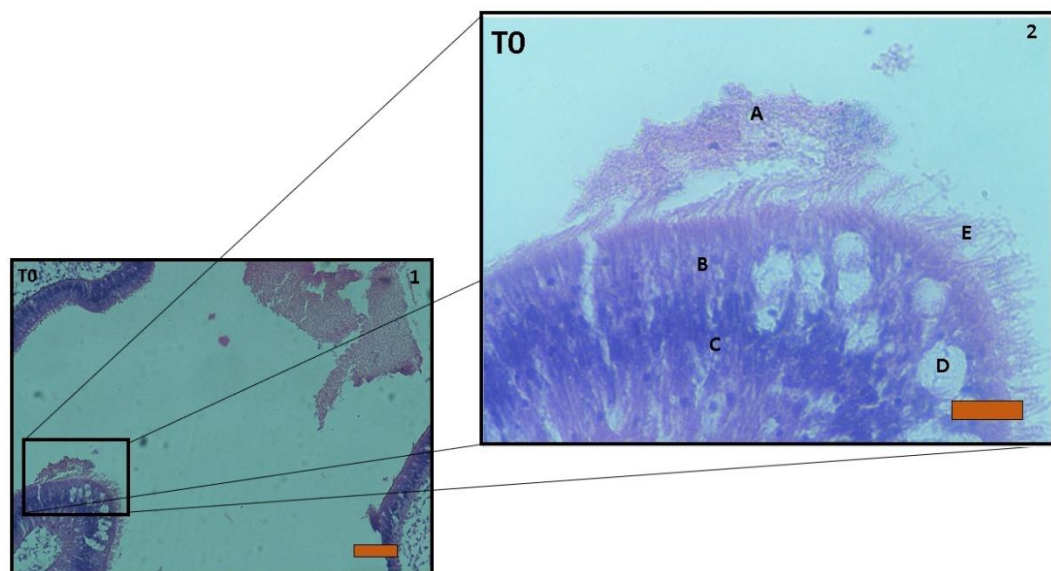


Figura 24. Observações histopatológicas em T0 (início do ensaio) do estômago da ostra (*Crassostrea gigas*) no grupo controlo. A – Conteúdo alimentar; B – produção de muco acompanhada de fissuras bem acentuadas bem evidentes no tecido epitelial; C – Diapedese de hemócitos ao estímulo inflamatório para junto da parede epitelial; D – Glândulas digestivas; E – Erosão epitelial. Escala 250 μm - 100x (1) e 1000 μm - 400x (2)

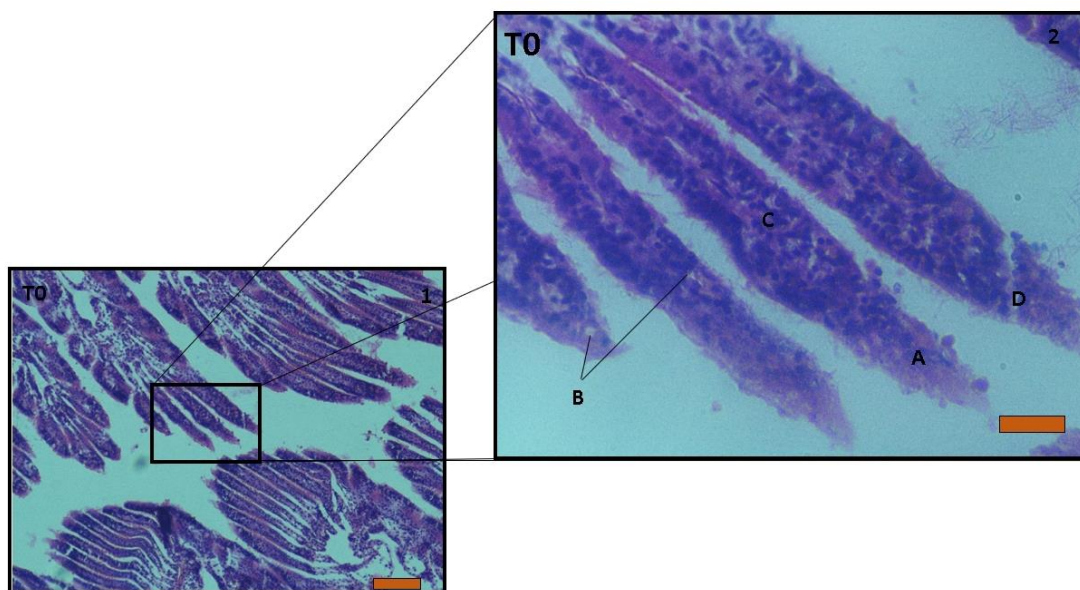


Figura 25. Observações histopatológicas em T0 (início do ensaio) dos filamentos branquiais da ostra *Crassostrea gigas* em controle. A – Necrose e produção de muco; B – glândulas mucosas; C – Diapedese de hemócitos ao estímulo inflamatório para junto da parede epitelial; D – laceração epitelial severa. Escala 250 μ m - 100x (1) e 1000 μ m - 400x (2)

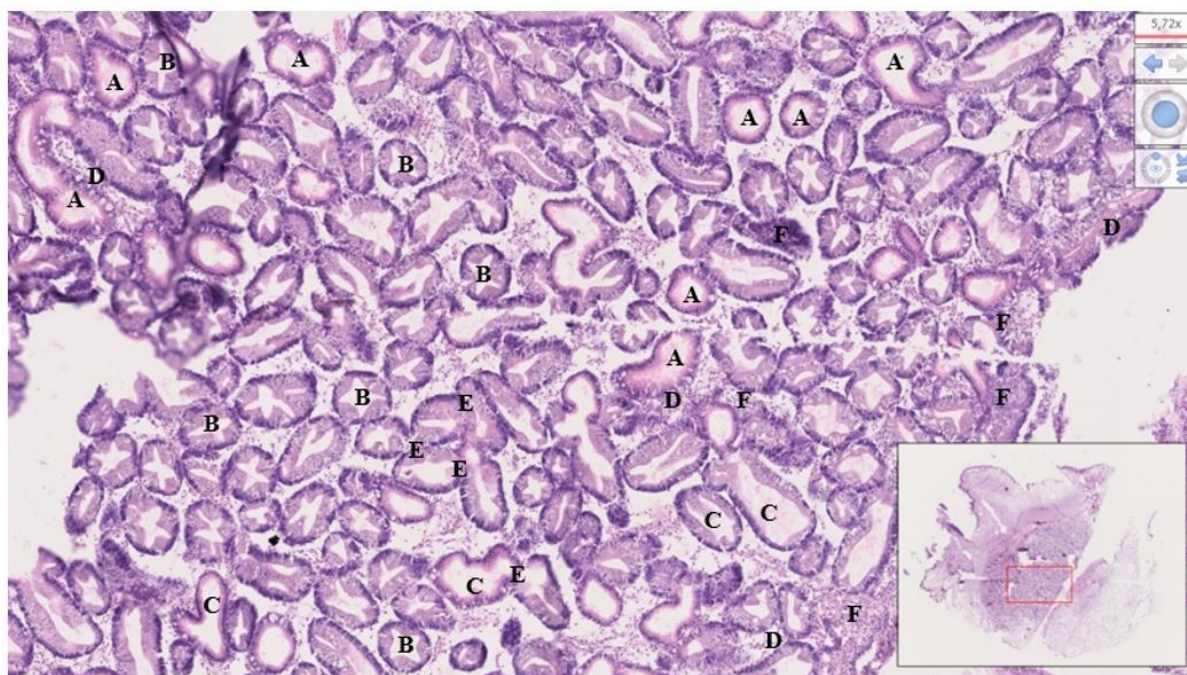


Figura 26. Fotografia dos túbulos intestinais da ostra *Crassostrea gigas* após 24 horas de contaminação com *Amyloodinium ocellatum* observados no digitalizador NANOZOOMER HAMAMATSU PHOTONICS. A – Inflamação localizada. B – Formato estrelar característico dos túbulos intestinais. C – Erosão da camada epitelial. D – Glândulas mucosas em produção. E – Fusão lamelar dos túbulos. F – hemócitos agregados ou em diapedese. Ampliação: 400x (5,72x)

Quando se procedeu à análise dos resultados das lesões (Tabelas do Anexo VI) com o ANOVA 1-way, em todas as lesões observadas, tanto em branquias como em trato digestivo, o valor de F foi sempre notoriamente inferior ao valor de F crítico e o valor de P (P value) foi sempre superior a 0.05 (intervalo de confiança), levando a concluir que as lesões causadas pelo parasita não foram significativas.

O top 3 dos valores mais baixos e que poderiam pôr em questão a leitura dos resultados foram:

Dispersão

- Digestivo - enterite	(0,953)
- Digestivo - necrose	(0,975)
- Branquias - necrose	(0,987)

Intensidade

- Branquias - erosão	(0,805)
- Digestivo - necrose	(0,975)
- Digestivo - Fusão lamelar	(0,983)

Todas os sinais de lesão observados nas brânquias e trato digestivo foram identificados do início ao fim do ensaio, demonstrando que estiveram sempre presentes, tanto no grupo de controlo, como no grupo de infetados.

4.5 Resultados de biologia molecular

Nas observações da dispersão das lesões notou-se que em T4 (4 horas) e T8 (8 horas) apresentaram maior número de variações de valores e que nas observações da intensidade das lesões se verificou um maior número de variações em T4, em ambos os grupos (controle e infetados).

Após amplificação por PCR, visualizaram-se os resultados através de uma eletroforese em gel de agarose. Foi possível a observação de fragmentos com cerca de 336 pares de base que, tanto nas Branquias (Fig.27A) como no trato digestivo (Fig.27B). Após sequenciação dos fragmentos amplificados confirmou-se que correspondem à subunidade pequena do gene 16s de RNA ribossomal do parasita *A. ocellatum*.

Como demonstrado nos resultados da Figura 27, o parasita *A. ocellatum* encontrava-se presente tanto nas brânquias como no trato digestivo das ostras infetadas durante o ensaio.

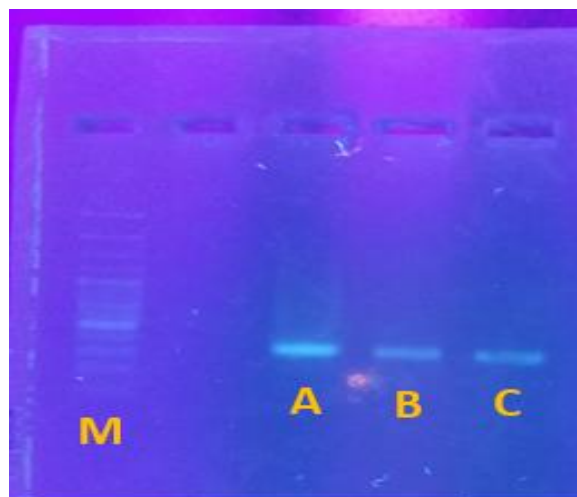


Figura 27. Resultados das amostras de ADN genómico submetidas a PCR e corridas em eletroforese de gel de agarose. M – Marcador de peso molecular; A – Amostra de Branquias de ostras (*Crassostrea gigas*) infetadas; B – Amostra de trato digestivo de ostras (*Crassostrea gigas*) infetadas e C – Controlo positivo de uma cavala infetada

4.6 Viabilidade dos dinósporos após filtração pelas ostras

As fezes recolhidas de cada tratamento eram distintas, como demonstrado na Figura 28, sendo as do controlo eram mais consistentes, mais integras, mais abundantes e aparentavam ter maior densidade, comparativamente às fezes das ostras do grupo das infetadas que aparentavam ser menos consistentes, menos abundantes e com menor densidade, parecendo indicar que não ter havido uma digestão completa por parte das mesmas e daqui advém a expressão de pseudo-fezes que, no fundo, são fezes características de uma digestão incompleta.

Os resultados das contagens encontram-se presentes no Gráfico 4, onde a contagem dos dinósporos teve início após a recolha das fezes (depois de T120). Dessa forma, o T0 representa o início das leituras e que decorreram 1 semana após o início do ensaio experimental.

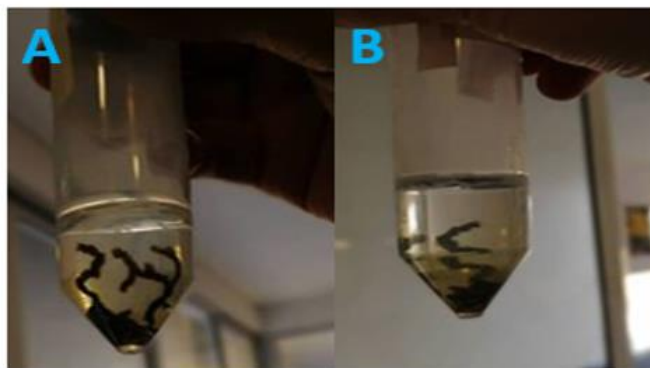


Figura 28. Amostras de Fezes de ostra (*Crassostrea gigas*), após ensaio (T120). A – Fezes de ostras de Controlo. B – Fezes de ostras infetadas com *Amyloodinium ocellatum*.

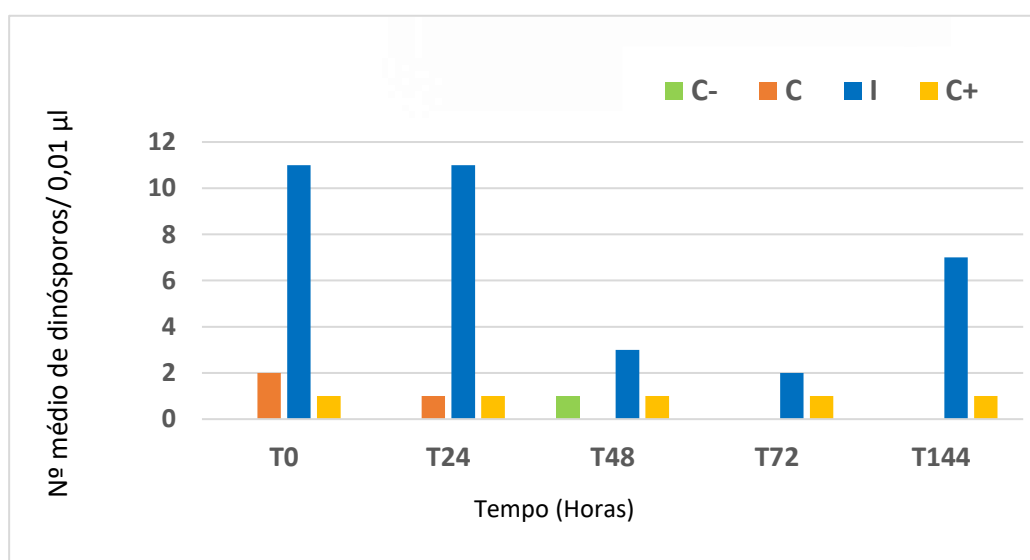


Gráfico 4. Média das contagens de dinósporos de *Amyloodinium ocellatum* nos poços de cultura. C- (Controlo Negativo), C (Controlo Experimental), I (Infetado Experimental) e C+ (Controlo Positivo)

Os valores de C- (controlo negativo) foram, tal como esperado, zero. Os valores de C (controlo experimental) não foram absolutamente nulos como seria de esperar. Os valores de I (infetado experimental) foram os mais elevados, como seria de esperar, mas não se mantiveram constantes ao longo de toda a avaliação.

Os valores de C+ (controlo positivo) mantiveram-se constantes e com presença de *A. ocellatum*, como seria de esperar, mas não foram detetados em abundância.

Os valores de C- (controlo negativo) foram, tal como esperado, zero. Apenas possui um único dinósporo em T48.

Os valores de C (controlo experimental) não foram absolutamente nulos como seria de esperar.

4.7 Fase de recuperação

A observação das ostras após o período de infeção foi continuada durante 2 meses (M2), num tanque de terra. Nessa observação foi registada a mortalidade e verificou-se que a mesma foi semelhante, entre os tratamentos, 5 ostras mortas no grupo controlo e 6 no grupo infetado ao fim de 2 meses.

5 Discussão de Resultados

As ostras são bivalves muito apreciados pelos consumidores nacionais e particularmente noutros países europeus como é o caso de França. O interesse na sua produção tem aumentado nos últimos anos no nosso país o que tem levado a um maior número de empresas que se dedicam à sua produção em ambientes naturais como seja o caso das zonas intertidais de rias e sistemas lagunares, mas também em produções integradas (com peixes) em tanques de terra batida.

Sendo a amiloidinose a causa de elevadas mortalidades em peixes produzidos em aquacultura especialmente em produções em tanques de terra, torna-se muito importante em cultivos integrados compreender qual o papel das ostras enquanto organismo filtrador nestes sistemas de produção. Se por um lado como filtradores podem contribuir para eliminar os dinósporos de *A. ocellatum* do meio de cultivo se ao passar pelo trato digestivo das ostras ficarem destruídos, ou se por acaso não ficarem inativados podem ser responsáveis por interferir no ciclo de produção deste parasita, potenciando novas infeções.

5.1 Dados biológicos

Apesar de as ostras do grupo infetado se apresentar com um peso médio e comprimento médio ($17,5\text{g} \pm 5,5\text{g}$ e $5,7 \pm 0,45\text{ cm}$) maior em relação ao grupo controlo ($15,9 \pm 5,0\text{g}$ e $5,4 \pm 0,6\text{ cm}$), as diferenças entre ambos não foi significativa de maneira a influenciar os resultados, reforçando esta ideia temos a sua origem ter sido do mesmo tanque de terra.

5.2 Parâmetros de qualidade da água

As condições fornecidas a ambos os tanques proporcionou condições favoráveis tanto para a ostra como para o parasita, de maneira a não prejudicar nenhum e evitar assim que variáveis como a temperatura e oxigénio consistissem um fator limitante no seu desempenho.

5.3 Observação da filtração das ostras

Um dos motivos pelos quais se acreditou que o fator de tempo de adaptação não tivesse causado um impacto decisivo foi o seu desempenho na filtração das microalgas fornecidas como alimento onde se pôde verificar que as ostras controlo se demonstraram eficazes na sua absorção, assim como na sua eliminação, como falaremos mais à frente.

Por outro lado, a presença do parasita no grupo infetado fez-se notar na diferença de cor da água entre os 2 tanques experimentais desde o T4, assim como no seu desenvolvimento (Fig. 20, 21 e 22).

Assim, verificou-se que na presença deste parasita na sua forma livre as ostras ficaram com a sua capacidade filtradora comprometida, tendo-se verificado a presença de microalgas por um período de tempo superior, contudo temos de considerar que foram adicionados dinósporos de *A. ocellatum* nesses tanques que por terem clorofila (Lom & Dyková, 1992; Reed & Francis-Floyd, 1994) podem estar a mascarar esta observação.

5.4 Histologia

Desde cedo que foram observadas lesões nas ostras nas observações histológicas efetuadas, nomeadamente no T0, o que pode ser justificado pelo facto das ostras serem provenientes de tanques de terra, meio multifatorial, com variações de temperatura, salinidade, entre outros que pode interferir com a fisiologia da ostra e também justificar as lesões iniciais observadas.

Acreditámos inicialmente que o parasita fosse o autor das lesões nas ostras, facto que apoiaria os resultados observados por Souza (2014), na medida em que as ostras sofreram lesões, tais como necrose, hiperplasia e erosão. No entanto, esta tipologia de lesões foi encontrada também em algumas ostras de controlo, o que nos suscitou dúvidas sobre a sua origem. Admitimos, por isso, a possível existência de um agente não identificado que tenha contribuído para que os resultados fossem tao semelhantes e que este se encontrasse presente em ambas as populações de ostras.

5.4.1 Avaliação do lúmen tubular do trato digestivo das ostras (área, perímetro e circularidade) – Avaliação biométrica

Com base nos resultados obtidos pelo programa *imagej*, observou-se que os valores da área do lúmen intestinal (Gráfico 1) das ostras de infetados divergiram mais da média que os valores das ostras de controlo (o desvio padrão foi superior). Os valores do perímetro tubular do trato digestivo (Gráfico 2) da ostra, só apresenta alterações nas ostras do grupo infetado em T48 tendo recuperado em T120.

No Gráfico 3, relativamente à circularidade dos lumens dos túbulos intestinais das ostras, os valores foram muito semelhantes entre si, havendo apenas um pequeno desvio em T24 pelas ostras de controlo que se recuperou em T48. Comparativamente à bibliografia pesquisada (Carella, 2015b), cujo os valores entre controlo e infetados são distintos entre si, podemos concluir que a circularidade, área e perímetro deviam ter sido também eles diferentes quando comparamos os grupos controlo e infetado neste ensaio.

Na bibliografia foram observados valores como $0,30 \pm 0,14$ no controlo e $0,61 \pm 0,13$ e neste ensaio obtivemos $0,52 \pm 0,06$ no controlo e $0,57 \pm 0,03$ em infetado.

Relativamente aos resultados histológicos, na análise à área do lúmen do intestino verificou-se que ao fim de 8 horas (T8) houve um decréscimo dessa área nas ostras do grupo infetado ($1313,9 \pm 196,5 \mu\text{m}^2$) relativamente ao controlo ($1919 \pm 218,24 \mu\text{m}^2$), que volta a recuperar após as 24 horas (T24) de ensaio. Este facto poderá querer dizer que na fase inicial de contacto existiu uma reação por parte do epitélio intestinal da ostra face a presença dos dinósporos com recuperação após 24 horas. Ao invés a circularidade só no T8 apresenta valores semelhantes entre os dois tratamentos, sendo sempre superiores no grupo infetado até T24. De fato a circularidade 1 (círculo perfeito) significa que existe uma perda de densidade epitelial e consequentemente atrofia epitelial, assim como diminuição da capacidade de absorção intestinal. Quando tal acontece, o lúmen intestinal apresenta-se também com um perímetro e área aumentados quando comparados ao que seria de esperar de um lúmen saudável. Este resultado está de acordo com o observado por Carrella *et al.* (2015), quando o mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) foi exposto ao dinoflagelado *Ostreopsis ovata*, onde os valores de circularidade mais baixos foram encontrados no grupo de controlo e o valor da circularidade do

grupo exposto a *O. ovata* foi superior. Verifica-se que quanto mais baixo for o valor da circularidade, mais saudável e menos exposta a *stress* se encontra o lúmen do intestino da ostra.

Relativamente ao perímetro do lúmen do trato digestivo das ostras os valores foram muito semelhantes. Apenas em T48 o grupo de infetado manifestou valores mais elevados (257,8 µm), comparativamente com o grupo controlo (209,5 µm). Da mesma maneira que, valores de área e perímetro mais pequenos pertenciam a lumens saudáveis, com presença de lisossomas (em atividade de absorção) e que valores de área e perímetro mais elevados estavam associados a inflamação, atrofia, com paredes finas (Carrela, 2015), o que pode indicar que o fim de 48 horas existe um efeito no trato digestivo que recupera no ponto de amostragem seguinte.

Do ponto de vista do teste ANOVA 1-way os resultados demonstram que, apesar de se notarem em diferenças entre o grupo controlo e o grupo infetado, não foram diferenças significativas para afirmar que a presença do parasita *A. ocellatum* não apresenta influência notória no desenvolvimento de lesões na ostra (hipótese nula).

5.4.2 Identificação e classificação das lesões nas branquias e trato digestivo das ostras – Avaliação celular

A intensidade das lesões observada nas brânquias da ostra do grupo Infetado (Tabela I do Anexo VI) apresentou em T120 valores superiores ao grupo controlo no que diz respeito à Hiperplasia Epitelial (2,5/2,0) e na Hiperplasia das células de muco (2,8/2,3), o que não ocorre na Hiperplasia das células granulares (2,2/3,0), mas se volta a verificar na Infiltração de hemócitos (3,8/3,3), fazendo-se notar mais na Necrose (2,5/1,5) e se mantém na Erosão (3,7/3,7), o que sugere que a presença do parasita potencia as lesões nas branquias da ostra.

A intensidade destas lesões, quanto à sua recuperação (Tabela II do Anexo VI), demonstrou que o grupo infetado apresentou em TM2 valores inferiores ao grupo controlo quanto à Hiperplasia Epitelial (2,3/2,7) e na Hiperplasia das células de muco (2,0/3,5), embora na Hiperplasia das células granulares esta tendência não se verifique (2,8/1,7), assim como na Infiltração de hemócitos cujos valores são equiparados (3,0/3,0), sendo que os valores inferiores do grupo infetado retomam na Necrose (1,0/3,0) e na Erosão (2,8/3,5), o que dá a entender que a presença do parasita é um fator limitador da recuperação da ostra.

A dispersão das lesões verificada nas branquias da ostra do grupo infetado (Tabela III do Anexo VI) deu-nos em T120 valores superiores face ao grupo controlo em quase todas as lesões observadas no ensaio experimental, exceto em Hiperplasia das células granulares (3,3/3,7), como podemos observar na Hiperplasia Epitelial (3,3/2,7), Hiperplasia das células de muco (3,0/2,7), Infiltração de hemócitos (4,5/4,3), Necrose (2,2/1,7) e Erosão (3,8/3,3). Estes resultados demonstram que a presença do parasita favorece o alastramento destas lesões nas branquias da ostra.

A Dispersão das lesões verificadas nas branquias na sua recuperação (Tabela IV do Anexo VI), demonstrou em TM2 que o grupo infetado mostrou valores inferiores ao grupo controlo nas lesões da Necrose (1,7/2,0) e na Erosão (3,3/3,8), resultado que não se verificou para a Hiperplasia Epitelial (3,0/2,8), para a Hiperplasia das células de muco (3,7/3,3) e Hiperplasia das células granulares (4,0/2,7) e na infiltração de hemócitos os valores foram equivalentes (4,0/4,0). Podemos deduzir que a ausência do parasita favorece a recuperação da ostra.

O grau de Intensidade das lesões no Trato Digestivo da ostra do grupo infetado (Tabela V do Anexo VI) revelou em T120 valores superiores ao grupo controlo em Hemócitos – infiltração (3,3/2,5), em Enterite (4,3/3,5), em Necrose (2,5/2,0) e em Erosão (3,0/2,5), embora nas lesões Hemócitos – agregados (3,3/3,3) e Regressão tubular (3,3/3,3) os valores se mantenham idênticos e apenas em fusão lamelar (3,3/3,5) o valor de controlo foi superior. Estes resultados levam-nos a supor que o contacto com o parasita estimula grande partes destas lesões no trato digestivo da ostra.

A recuperação das lesões no Trato Digestivo da ostra na sua Intensidade, no grupo infetado (Tabela VI do Anexo VI) evidenciou em TM2 que o grupo infetado apresentou valores inferiores ao grupo controlo em Hemócitos – infiltração (3,7/4,0), Hemócitos – agregados (3,7/4,3) e Erosão (3,0/3,3), sendo que os valores se mantêm idênticos em Regressão tubular (4,0/4,0) e superiores em Enterite (4,0/3,7), Fusão Lamelar (2,8/2,5) e Necrose (3,0/2,5). Estes dados levam-nos a deduzir que a remoção do parasita do meio-ambiente da ostra, permite que esta dê visíveis sinais de recuperação.

A Dispersão das lesões observadas no Trato Digestivo da ostra do grupo infetado (Tabela VII do Anexo VI) apresentou em T120, com exceção em Hemócitos – Infiltração (2,8/3,0), valores superiores em todas as lesões quando comparado ao grupo controlo, como

verificamos nos Hemócitos – agregados (2,8/1,5), em Enterite (4,3/3,8), em Fusão lamelar (1,8/1,3), em Regressão tubular (2,0/1,0), em Necrose (2,5/1,0) e em Erosão (3,3/2,0). Estes valores levam-nos a crer que a presença do parasita contribui consideravelmente, para a dispersão das lesões no trato digestivo.

A recuperação das lesões no Trato Digestivo da ostra na sua Dispersão, no grupo infetado (Tabela VIII do Anexo VI) em TM2 demonstrou valores inferiores em Hemócitos – infiltração (3,7/4,2) e em Hemócitos – agregados (3,7/4,3), apresentando valores superiores na Enterite (5,0/4,0), na Fusão lamelar (1,3/1,0), na Necrose (2,0/1,7) e na Erosão (2,5/2,2) e valores equivalentes na Regressão tubular (1,7/1,7). Com base nestas observações podemos supor que a recuperação da dispersão das lesões no trato digestivo foram bastante discretas pela remoção do parasita no período de recuperação após ensaio experimental.

Em comparação com o estudo de Souza (2014) verificamos que nas lesões em ambos os estudos as ostras sofrem uma evolução progressiva das lesões e que estas aumentam no final do ensaio experimental, quando comparado ao início do ensaio experimental.

É importante não esquecer que é escassa a bibliografia disponível sobre a qualificação de lesões o que torna difícil estabelecer termos comparativos sobre os resultados que obtivemos neste ensaio experimental do parasita na ostra. Da doutrina conhecida apenas podemos colher informação genérica que confirma a existência de lesões sem, no entanto, encontrarmos dados concretos sobre a sua dimensão quantitativa. Com base nos estudos efetuados em *A. ocellatum* (Souza, 2014) retiramos que o parasita contribui para o aparecimento de lesões, entre elas hipertrofia, hiperplasia, erosão e necrose epitelial nas branquias e trato digestivo da ostra, o que dificulta a sua recuperação.

Por outro lado, da bibliografia disponível (Souza, 2014; Vargas, 2015; Carella, 2015b) não resulta um critério único de estudo que nos permita, com segurança, estabelecer, de forma linear, comparações entre os resultados obtidos neste estudo e outros estudos de interesse similar, dado que cada autor adaptou um padrão personalizado que melhor se adaptou ao(s) seu(s) tema(s). Este ensaio experimental não foi diferente.

Como é já conhecido, o parasita é mortífero para uma vasta variedade de peixes, sejam estes teleósteos ou elasmobrânquios, mas em contacto com bivalves existe pouca informação disponível que permita determinar a dimensão dos seus efeitos. O interesse desta interação torna-nos mais conscientes sobre o potencial do parasita em meio de cultura onde o parasita consegue

atingir concentrações alarmantes quando não vigiado e deixa-nos informados em relação ao risco da ostra quando portadora de *A. ocellatum*.

Os tecidos alvos da ostra estudados em histologia neste ensaio foram as brânquias e o trato digestivo e ambos apresentaram lesões ao mesmo nível (dispersão e intensidade).

Quando se realizou o ANOVA 1-way dos valores histológicos observados nos Gráficos (Anexo V e VI) não foram em conta o esperado e quando calculado o valor F podemos notar que os 2 grupos (infetado e controlo) apresentaram valores muito próximos entre si, com algumas exceções que, para grande surpresa e controvérsia da bibliografia (Souza, 2014), foram tendencialmente mais notórios no grupo controlo em diversas situações, não correspondendo ao esperado. Esta situação foi identificada tanto em Dispersão, como em Intensidade. Os valores daqui retirados apoiavam que não existia diferenças significativas entre os dois grupos, logo, que a presença do parasita *A. ocellatum* não apresenta influência notória no desenvolvimento de lesões na ostra (hipótese nula).

Por outro lado, a anatomia branquial característica das ostras as quais não possuem a cartilagem encontrada em brânquias de peixes (cujas cartilagens lhes permite preservar a integridade e a arquitetura branquial, facilitando a observação e, concedendo-lhe maior defesa por não se encontrarem tão sensíveis ou expostas a fatores externos como a manipulação para a técnica histológica) pode, igualmente, contribuir ou conduzir a resultados distintos dos esperados.

5.5 Biologia molecular

Os resultados na observação resultaram em positivo em ambas as amostragens (trato digestivo e brânquias), embora a sua opacidade não fosse tão nítida ou evidente como no controlo positivo. Esta situação pode resultar de vários fatores, como por exemplo, a quantidade inicial de amostra utilizada, possuir ADN de interesse em quantidades reduzidas, refletindo-se em bandas mais discretas/ menos nítidas.

A identificação do parasita no interior das amostras de brânquias e trato digestivo vem confirmar a suspeita levantada pela contagem de dinósporo na sedimentação de fezes e reforçar que a ostra absorveu o parasita.

5.6 Viabilidade dos dinósporos

Ainda antes da observação dos resultados, na recolha das fezes podemos notar que as fezes do grupo controlo eram bastante distintas das fezes do grupo infetado (Fig. 28). O grupo controlo tinha apresentado o que se considera umas fezes naturais e típicas de um animal que se encontra adaptado ao meio em que se encontra, o que reforçou a ideia de que o fator de tempo de adaptação não tivesse causado um impacto decisivo.

Foram identificados dinósporos com capacidade móvel após incubação, pelo que concluímos que o parasita sobrevive à passagem pelo trato digestivo da ostra. Porém, não nos foi possível colocar os dinósporos em contacto com nenhum peixe, o que não nos permitiu confirmar se os mesmos mantiveram a sua capacidade infetante.

Para garantir que as fezes não apresentariam contaminadas com possíveis dinoflagelados existentes na água, foram realizadas análises à água durante todo o ensaio experimental com o objetivo de detetar possíveis dinósporos livres que não tivessem sido filtrados pela ostra. Verificou-se que no dia seguinte ao início da experiência (24h depois do início do ensaio) não foram encontrados dinósporos, o que nos fez acreditar que todos eles tinham sido filtrados e que todos os dinósporos presentes nas fezes seriam dinósporos que teriam atravessado o trato digestivo da ostra. Os valores observados nas contagens de dinósporos das fezes/pseudo-fezes serviram como vários indicadores, tais como (1) vigilância e garantia da presença do parasita em contacto com as ostras infetadas e que estes tinham sido absorvidos pela ostra, (2) da resistência e sobrevivência do parasita pelo trato digestivo e (3) que o dinósporo se mantinha ativo, embora não possamos assumir que o mesmo mantenha capacidade infecciosa caso encontre um hospedeiro.

Os valores das contagens de fezes e pseudo-fezes colocadas em cultura demonstraram ser muito baixos para sugerir que o parasita se tivesse multiplicado no interior das ostras (Moreira *et al.* 2017), juntamente não foram identificados tomontes ou trofontes em histologia, embora a técnica por si só não possa ser considerado um diagnóstico definitivo. Não foram realizadas amostras do fundo dos tanques para tomontes.

Gráfico 4:

Acredita-se que os valores de I (infetado experimental) não se terem mantido constantes ao longo de toda a avaliação se deveu a variáveis que tiveram mais impacto para tal acontecimento foram o

tempo de vida útil do dinósporo ou devido a uma possível enquistação por parte do parasita para se defender da ostra (Paperna, 1984).

O grupo C- (controlo negativo), possuiu um único dinósporo em T48 mas que se acreditou ser um erro de observação ou uma possível contaminação. Julga-se também que os valores de C (controlo experimental) se deveu à proximidade entre a amostra de controlo e infetados, dado que o parasita pode ser transportado por fomites, aerossóis ou por quem esteja a manipular a experiência (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

5.7 Outras observações

Apesar de todo o *stress* e das diversas agressões a que a ostra foi submetida, a taxa de mortalidade foi igual nos dois grupos (controlo e infetado), levando a acreditar que o parasita *A. ocellatum* não seja um agente capaz de causar lesões profundas e irreversíveis na ostra.

Após todo o ensaio experimental ter decorrido, existiram algumas variáveis que infelizmente não puderam ser trabalhadas, mas que alimentaram alguma curiosidade e interesse para possíveis estudos futuros. Em todas estas variáveis não existem garantias de que as respostas e os resultados fossem os mesmos. Entre elas estão:

- O ensaio foi realizado em 21°C por ser uma temperatura compatível com a ostra e o parasita, mas não existem garantias que existiriam as mesmas respostas se o ensaio fosse realizado a temperaturas superiores ou inferiores a esta.
- Ostras de tamanhos e pesos diferentes (maiores e menores) das utilizadas, assim como o uso de mais espécies, como por exemplo a ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*).
- O uso de ostras de tanques de interior, expostas a menos variáveis para comparar com os resultados das ostras de tanques externos
- Exposição dos dinósporos a peixes no final do ensaio para testar se os parasitas, após a exposição com a ostra, estavam aptos a parasitar peixes.
- Neste ensaio foi realizaum intervalo de segurança de vinte e quatro horas. A aplicação de diferentes intervalos de segurança, ou até mesmo a ausência do mesmo.
- Neste ensaio, a concentração era de 1000/ml³ e a utilização de diferentes concentrações de dinósporos presentes na água ficaram em aberto, como por exemplo concentrações como 500/ml³ ou 250/ml³.

6. Conclusões

1. O parasita encontra-se no interior da ostra, como confirmado pela técnica molecular e vigiado pelas avaliações efetuadas às águas dos dois tanques. Sendo esta a única variável diferente presente em apenas um dos tanques, acredita-se que a causa para as diferenças observadas se deva ao parasita. Esta afirmação é válida para os resultados identificados como a diferença da filtração do meio durante o ensaio e nas diferenças entre as fezes recolhidas.
2. Apesar das lesões identificadas e como os resultados observados em histologia da média da área, circularidade e perímetro dos túbulos digestivos não terem sido idênticos entre si, apesar dos valores de controlo e infetado não se diferenciarem significativamente, leva-nos a acreditar que a variável inserida e alvo de estudo (o parasita *Amyloodinium ocellatum*) não causa alterações notórias nas ostras, ou pelo menos não nestas 3 variáveis supra identificadas, permitindo que estas, após a absorção do parasita, sobrevivam, cresçam e continuem vivas, ultrapassando o choque inicial do seu contato.
3. Ao contrário das brânquias dos peixes onde encontramos cartilagem, as ostras, por não a possuírem, beneficiam de maior controlo/mobilidade. Como tal, não oferecem a mesma resistência e são mais sensíveis e suscetíveis à manipulação externa, como a técnica histológica, podendo induzir em erros de interpretação em falsos positivos de lesões branqueais. Isto porque em algumas lâminas foram observados arcos braquiais e lamelas quebradas, sem que fossem acompanhadas de outros sinais de lesão (inflamação, erosão, necrose, etc), levando a suspeitar que se deveu a fatores relacionados com a técnica aplicada.
4. Como observado em biologia molecular e nas observações de histologia, o parasita foi identificado no interior da ostra e pelos resultados observados nas análises de fezes, este é libertado, mantendo a sua capacidade móvel, o que nos demonstra que (A) o parasita sobrevive e tolera a depuração da ostra e que esta não possui capacidades de eliminar/neutralizar o parasita na sua fase móvel. Esta não pode ser utilizada como solução para o combate ao parasita nas explorações. A parede do quisto e as toxinas que se crê que o parasita utiliza para se proteger, aparentam ser mecanismos eficazes na sua sobrevivência, permitindo que este não seja destruído até sair do interior da ostra para o exterior. (B) Uma vez que o parasita sobrevive dentro da ostra e aí se mantendo, faz desta um potencial vetor, caso esta seja movida (por exemplo: por ação humana) para um novo

meio que ainda não esteja infetado com *A. ocellatum*, como por exemplo um tanque diferente. O que se traduz numa necessidade de realizar quarentena não só aos peixes, mas também às ostras antes de as introduzirmos num novo tanque, de maneira a evitar contágios desnecessários e fáceis de evitar e que estes fizessem parte da rotina/protocolo para sempre que esta situação se verificasse.

5. Pelo facto a ostra poder ser utilizada como vetor por parte do parasita, é de salientar que, à semelhança dos peixes, também esta carece de um protocolo de quarentena. Por falta de informações por parte de outros bivalves em relação a este parasita, sugere-se que se realize um protocolo de quarentena, também para estes, a fim de evitar contaminações desnecessárias em tanques negativos ao parasita. Reforçamos que não existem tratamentos 100% eficazes até ao momento e os tratamentos convencionais são dispendiosos e que a prevenção nos pode poupar muito mais do que todo o possível prejuízo de o ignorar.
6. Os resultados observados, ao contrário do esperado, não demonstraram serem significativamente divergentes em mais do que um ponto de avaliação realizado. Com base neste facto, salientam-se as seguintes hipóteses:

- O parasita não causou lesões significativas nas ostras, o que vai em desacordo com o que Souza (2014) afirma, apesar de as ostras neste ensaio terem sido submetidas a uma exposição de 120 horas e não apenas a 48.

- Não houve um período de espera/intervalo de adaptação ao novo meio onde foi iniciada a experiência (temperatura, salinidade, etc), o que pode ter influenciado a condição da ostra na sua eficácia como filtradora natural.

- Não foi realizada uma quarentena pré-ensaio para descartar que as ostras que poderão ter iniciado a experiência sem se encontrarem nas suas melhores condições, isto porque as ostras são provenientes de um meio multifatorial (tanque de terra, aberto), podendo ser influenciadas por um fator que tenha pesado mais do que o parasita

7. Dada a importância deste parasita para o meio aquático, é importante que se continue a investigar tratamentos alternativos a fim de permearmos a produção e métodos mais económicos, eficazes e também mais amigos do ambiente, como as vacinas e alternativas biológicas (Soares, *et al.*, 2011), a fim de se evitar contaminações ambientais desnecessárias, assim como possibilidade de escolhas de tratamentos que se adaptem mais a cada situação. Para que tal possa ocorrer, é necessário que existam mais armas de

combate, a fim de oferecer maior qualidade de vida aos animais e uma maior segurança para quem investe nesta área, sejam elas explorações de produção ou exposição/ornamentais.

8. Sendo de salientar que a ostra pode ser um vetor de transmissão do parasita, é importante que, à semelhança dos peixes, também esta seja submetida a um protocolo de quarentena. Por falta de informações por parte de outros bivalves em relação a este parasita, defendemos que se realize um protocolo de quarentena, também para estes, de forma a serem impedidas contaminações evitáveis em tanques negativos ao parasita. Não existem tratamentos 100% eficazes até ao momento e os tratamentos convencionais são dispendiosos (Soares, F. *et al.* 2012).

7. Referências bibliográficas

- Adlard, R. D.; Miller, T. L. & Smit, N. J. (2015). The butterfly effect: Parasite diversity, environment, and emerging disease in aquatic wildlife. *Trends in Parasitology*, 31(4), pp. 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.001>
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). *Diseases caused by flagellates*. In: *Fish Diseases*, Volume 1, Eiras, J.C., H. Segner, T. Wahli, and B.G. Kapoor (Eds). Science Publishers: Enfield, NH, pp. 421-515.
- Aravindan N.; Chaganti K. & Aravindan S. (2007) Protozoan parasites in commercially important shrimp species from northeast coast of Andhra Pradesh. *Indian Journal of Experimental Zoology* 10, pp. 9 – 20.
- Auffret, M. (1988). Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 46(April 1986), pp. 101–107. <https://doi.org/10.3354/meps046101>
- Bacca H. (2007). Etude des voies metaboliques des sucres chez l’huitre creuse *Crassostrea gigas*. Implication dans les Mortalites estivales. Relatório de tese IFREMER/ Universte de Rennes. France, p.218.
- Barbaro, A. & Francescon, A. (1985) Parassitosi da *A. ocellatum* (Dinophyceae) su larve di *Sparus aurata* allevate in un impianto di riproduzione artificiale. *Oebalia* 11, pp. 745-752.

- Batista, FM. Ben-Hamadou R, Fonseca VG, Taris N, Ruano F, Reis-Henriques MA, Boudry P 2008. Comparative study of shell shape and muscle scar pigmentation in the closely related cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their reciprocal hybrids. *Aquatic Living Resources* 21: pp 31-38.
- Becker, C.D. (1977) Flagellate parasites of fishes. In: Krier, J.P. (Ed.) *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, pp. 357-416.
- Boudry P, Heurtebise S, Collet B, Cornette F, Gérard A 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 226: pp 279-291
- Bower, S.M.; Mcgladdery, S.E.; Prince, I.M. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited Shellfish. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, v.4, pp.1-199
- Brown, E. M. & Hovasse, R. (1946). *A. ocellatum* (Brown), a Peridinin Parasitic on Marine Fishes. A Complementary Study. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 116(1), pp. 33–46. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1946.tb00107.x>
- Cardeilhac, P. T. & Whitaker, B. R. (1988). Tropical fish medicine. Copper treatments. Uses and precautions. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 18(2), pp. 435–448. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(88\)50041-4](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(88)50041-4)

- Chagas, R. A. (2016). Biofouling no cultivo da ostra do Mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) (*Bivalvia: Ostreidae*) em um estuário amazônico [Universidade Federal Rural da Amazônia - Belém, Pará, Brazil; 2016]. Em *Trabalho de Conclusão de Curso (graduação), Apresentado ao Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA*. <https://doi.org/https://doi.org/10.2312/EBT.thesis.Chagas.2016>
- Cajaraville, M.; Díez, G.; Marigómez, I. & Angulo, E. (1990). Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, pp. 221–228. <https://doi.org/10.3354/dao009221>
- Cajaraville, P. M.; Marigómez, J. A.; Díez, G. & Angulo, E. (1992). Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels-2. Quantitative alterations in the structure of the digestive tubules. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 102(1), pp. 113–123. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(92\)90052-9](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90052-9)
- Carella, F.; Feist, S. W.; Bignell, J. P. & De Vico, G. (2015a). Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131(October 2017), pp. 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.012>
- Carella, F.; Sardo, A.; Mangoni, O.; Di Cioccio, D.; Urciuolo, G.; De Vico, G. & Zingone, A. (2015b). Quantitative histopathology of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) exposed to the harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127(March), pp. 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.001>

- Cecchini, S.; Saroglia, M.; Cognetti-Varriale, A. M.; Terova, G. & Sabino, G. (2001). Effect of low environmental temperature on embryonic development and egg hatching of *Diplectanum aequans* (*Monogenea, Diplectanidae*) infecting European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish Pathology*, 36(1), pp. 33–34. <https://doi.org/10.3147/jsfp.36.33>
- Chu, F. L. E.; Soudant, P. & Lund, E. D. (2003). *Perkinsus marinus*, a protozoan parasite of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Effects of temperature on the uptake and metabolism of fluorescent lipid analogs and lipase activities. *Experimental Parasitology*, 105(2), pp. 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2003.11.002>
- Chrisfilogiannis, P. (1993). The Veterinary Approach to Sea-bass and Sea-bream. In: *Aquaculture for Veterinarians: fish husbandry and medicine*. Editor: Lydia Brown. Pergamon Press Ltd., Oxford, England, pp.379-394.
- Comps M, Bonami JR, Vago C, Campillo A 1976. Une virose de l’huitre Portugaise (*Crassostrea angulata* Lamarck). *Comptes Rendus de l’Academie des Sciences, Série 3, Sciences de la Vie*, Vol. 282: pp 1991-1993.
- Couch, J. A. (1984). Atrophy of diverticular epithelium as an indicator of environmental irritants in the oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, 14(1–4), pp. 525–526. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(84\)90145-4](https://doi.org/10.1016/0141-1136(84)90145-4)
- de Montaudouin, X.; Paul-Pont, I.; Lambert, C.; Gonzalez, P.; Raymond, N.; Jude, F.; Legeay, A.; Baudrimont, M.; Dang, C.; Le Grand, F.; Le Goïc, N.; Bourasseau, L. & Paillard, C. (2010). Bivalve population health: Multistress to identify hot spots. *Marine Pollution Bulletin*, 60(8), pp. 1307–1318. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.03.011>

De Vico, G. & Carella, F. (2012). Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Research in Veterinary Science*, 93(3), pp. 1109–1115.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.014>

Dickerson, H. W. & Clark, T. G. (1996). Immune response of fishes to ciliates. *Annual Review of Fish Diseases*, 6(2), pp. 107–120. [https://doi.org/10.1016/S0959-8030\(96\)90008-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8030(96)90008-3)

Duarte Oliveira, N. (2012). Definição De Critérios De Seleção De Progenitores De Ostra Portuguesa *Crassostrea Angulata* (Lamarck 1819) Sujeitos a Diferentes Condições Ambientais: Relação Entre a Qualidade Dos Progenitores, Posturas E Larvas [Universidade do Algarve - Faculdade de Ciências e Tecnologias]. In *Universidade do Algarve* (Issue Lamarck 1819), pp 16-17.

http://www1.ci.uc.pt/mhidro/edicoes_antigas/Tratamentos_Residuos_Solidos.pdf

Eble A & Scro R. (1996) General anatomy. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. Edited by Maryland sea Grant College, University of Maryland System, College Park.

Eiras, J. C., (1994). *PROTOZOA*. In: *Elementos de Ictioparasitologia*. Fundação Eng. António de Almeida, Porto, Portugal, pp.15-123.

Ellis, M.S.; Barber, R.D.; Hillman, R.E.; Kim, Y. & Powell, E.N., (1998). Histopathology analysis. In: Lauenstein, G.G., Cantillo, A.Y. (ed.), Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Projects: 1993–1996 *National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum*, NOS/ORCA, 130. 1998. pp. 198–215.

FAO (2012). Fisheries and Aquaculture. In *Echinoderms: Durham*, pp. 559–559
<https://doi.org/10.1201/9780203869543-p6>

FAO. (2016). EDevelopment-assessment as «smart eplanning» for New South Wales (NSW) Australia. Em *CUPUM 2015 - 14th International Conference on Computers in Urban Planning and Urban Management*.

FAO (2020), Department, F. F. and A. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. FAO.
<https://doi.org/10.4060/ca9229en>

Fioravanti, M.L.; Caffara, M.; Florio, D.; Gustinelli, A.; Marcer, F. & Quaglio, F. (2006).
Parasitic diseases of marine fish: epidemiological and sanitary considerations.
Parasitologia 48, pp. 15–18.

Francis-Floyd, R. & Floyd, M. R. (2011). *A. ocellatum*, an Important Parasite of Cultured Marine Fish. Em *SRAC Publication No. 4705* (English, Número 4705). [Stoneville, Miss.?] : Southern Regional Aquaculture Center, [2011].
<http://agrilife.org/fisheries/files/2013/09/SRAC-Publication-No.-4705-Amyloodinium-ocellatum-an-Important-Parasite-of-Cultured-Marine-Fish.pdf>

Galimany, E.; Sunila, I.; Hégaret, H.; Ramón, M. & Wikfors, G. H. (2008). Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae*, 7(5), pp. 630–638.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.01.001>

- Gaspar, P. & I. P. (2017). *Boas Práticas Em*.
https://www.researchgate.net/publication/317413680_Boas_praticas_em_cultivo_de_ostra_-_Algarve
- Ghittino, P.; Bignami, S.; Annibali, A.; Boni, L. (1980) Prima segnalazione di grave Oodiniassi in branzini (*Dicentrarchus labrax*) allevati intensivamente in acqua salmastra. *R i v. It. Piscic. Ittiop.*, A. 15 pp. 122-127.
- Gómez, F. & Gast, R. J. (2018). Dinoflagellates *Amyloodinium* and *Ichthyodinium* (Dinophyceae), parasites of marine fishes in the South Atlantic Ocean. *Diseases of Aquatic Organisms*, 131(1), pp. 29–37. <https://doi.org/10.3354/dao03274>
- Herbert RJH, Humphreys J, Davies CJ, Roberts C, Fletcher S, Crowe TP 2016. Ecological impacts of non-native Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and management measures for protected areas in Europe. *Biodiversity and Conservation* 25: pp 2835-2865.
- Højgaard, M. (1962). Experiences made in Denmark's Akvarium concerning the treatment of *Oodinium ocellatum*. *Bulletin de l'Institut Oceanographique (Monaco)*, Numero Special 1A: pp. 77-79.
- Keller, C.J. (2006). *Amyloodinium* in elasmobranchs. *Proceedings of the 31st Eastern Fish Health Workshop*, Mt. Pleasant, SC, March 2006. p. 18.
- Kingsford, E. (1975) *Treatment of Exotic Marine Fish Diseases*. Palmetto Publishing, St Petersburg, Florida, p. 90.

- Kuperman, B. I. & Matey, V. E. (1999). Massive infestation by *A. ocellatum* (Dinoflagellida) of fish in a highly saline lake, Salton Sea, California, USA. In *Diseases of Aquatic Organisms* (Vol. 39, Número 1, pp. 65–73). Department of Biology and Center for Inland Waters. <https://doi.org/10.3354/dao039065>
- Landsberg, J. H. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science*, 10(2), pp. 113–390. <https://doi.org/10.1080/20026491051695>
- Langton, R. W. (1975). Synchrony in the digestive diverticula of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 55(1), pp. 221–229. <https://doi.org/10.1017/S0025315400015861>
- Lauckner, G. (1984) Diseases caused by protophytans (algae). In: Kinne, O. (Ed.) *Diseases of Marine Animals*, Vol. IV, Part 1, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, pp. 169-180.
- Lawler, A. R. (1980). Studies on *A. ocellatum* (Dinoflagellata) in Mississippi Sound: Natural and Experimental Hosts. *Gulf Research Reports*, 6(4), pp. 403–413. <https://doi.org/10.18785/grr.0604.08>
- Levy, M.G.; Poore, M.F.; Colorni, A.; Noga, E.J.; Vandersea, M.W. & Litaker, R.W. (2007). A highly specific PCR assay for detecting the fish ectoparasite *Amyloodinium oscellatum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73, pp. 219-226.

- Lom, J. & Dyková, I. (1992). Flagellates (*Phylum Mastigophora* Diesing, 1866). In: *Protozoan Parasites of Fishes*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Neatherlands, pp. 25-74.
- Lom, J. & Lawler, A.R. (1973). An ultrastructural study on the mode of attachment in dinoflagellates invading gill of *Cyprinodontidae*. *Protislogica* 9 pp. 293-309.
- Lowe, D. M. (1988). Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. 46, pp. 91–100.
- Lowe, D. M.; Moore, M. N. & Clarke, K. R. (1981). Effects of oil on digestive cells in mussels: Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology*, 1(3–4), pp. 213–226. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(81\)90016-3](https://doi.org/10.1016/0166-445X(81)90016-3)
- Mario Vargas, L.; Nieves Sandoval, C.; Eva Casas, A.; Gloria Pizango, P. & Alberto Manchego, S. (2015). Parasites and histopathological lesions in gills of juvenile gamitana (*Colossoma macropomum*) raised in semi-intensive farming | Parásitos y Lesiones Histopatológicas en Branquias de Gamitanas (*Colossoma macropomum*) Juveniles bajo Crianza Semiintensiva. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*, 26(4), pp. 577–586. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11222>
- Marques, C.L., Medeiros, A., Moreira, M, Quental-Ferreira, H., Mendes, A. C., Pousão-Ferreira, P., & Soares, F. (2019). Report and genetic identification of *Amyloodinium ocellatum* in a sea base (*Dicentrarchus labrax*) broodstock in Portugal. *Aquiculture Reports*, 14, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100191>

- Medhioub, W.; Lassus, P.; Truquet, P.; Bardouil, M.; Amzil, Z.; Sechet, V.; Sibat, M. & Soudant, P. (2012). Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Aquaculture*, pp. 108–115, 358–359.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.023>
- Menezes, J. (1994). Doenças em peixes cultivados no Estuário do Sado e seu controlo. Seminário sobre *Recursos Haliêuticos, Ambiente, Aquacultura e Qualidade do Pescado da Península de Setúbal*, pp.175-186.
- Menezes J (2000). Manual sobre doenças de peixes ósseos. *Publicações avulsas do IPIMAR* 3, 214 pp.
- Montgomery-Brock, D., Sato, V. T., Brock, J. A., & Tamaru, C. S. (2001). The application of hydrogen peroxide as a treatment for the ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) on the Pacific Threadfin *polydactylus sexfilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(2), 250–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb01103.x>
- Moreira, C. B.; Hashimoto, G. S. de O.; Rombenso, A. N.; Candiotto, F. B.; Martins, M. L. & Tsuzuki, M. Y. (2013). Outbreak of mortality among cage-reared cobia (*Rachycentron canadum*) associated with parasitism. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(4), pp. 588–591. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000400021>
- Moreira, M.; Schrama, D.; Soares, F.; Wulff, T.; Pousão-Ferreira, P. & Rodrigues, P. (2017). Physiological responses of reared sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) to an *A. ocellatum* outbreak. *Journal of Fish Diseases*, 40(11), pp. 1545–1560.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12623>

Morton, B. (1971). The diurnal rhythm and tidal rhythm of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. Em Biological Journal of the Linnean Society (Ed.), *Biological Journal of the Linnean Society* (Biological, Vol. 3, Número 4). Department of Zoology.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1971.tb00526.x>

Morton, B. (1983). Feeding and digestion in bivalvia. In: Saleuddin, A.S.M., Wilburg, M. (Eds.), *The Mollusca, vol. 5, Chapter 2*. Academic Press, New York, 52 pp. 65 – 147.

Murray, A. G. & Peeler, E. J. (2005). A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. Em ELSEVIER (Ed.), *Preventive Veterinary Medicine* (Vol. 67, Números 2-3 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.10.012>

Nash, Colin, E. (2011). *The Hystory of Aquaculture*. (First Edition). Iowa, USA. Wiley-Blackwell. pp. 185-196.

Noga, E.J. (2010). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, (Second Edition). Wiley-Blackwell: Ames, IA. pp. 143-147.

Noga E.J. (2012) *A. ocellatum*. In: *Fish Parasites - Pathobiology and Protection* (Ed. by K. Buchmann & P.T.K. Woo), CABI Publishers, Preston, UK. pp. 19–29.

- Noga, E. J.; Ullal, A. J.; Corrales, J. & Fernandes, J. M. O. (2011). Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation responses. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 6(1), pp. 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2010.06.001>
- Noga, E.J. & Levy, M.G. (1995). Dinoflagellida (*Phylum Sarcomastigophora*) In: P.T.K. Woo (Ed.) *Fish Diseases and Disorders*. Volume 1: *Protozoan and Metazoan Infections*. Wallingford, Oxon, United Kingdom: CAB International. pp. 1-25.
- Noga, E.J. & Levy, M.G. (2006). *Phyllum Dinoflagellata*. IN: *Fish Diseases and Disorders*, Volume I: *Protozoan and Metazoan Infections*, P.T.K. Woo (ed). CAB International: Oxford, UK. pp. 16-45.
- Oestmann, D. J.; Lewis, D. H. & Zettler B. A. (1995). Lymphocystis in Red Drum. *Journal of Aquatic Animal Health*, 7 (January 2015), pp. 231–235. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1995\)007](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1995)007)
- Owen, G. (1996). Feeding. In: Wilburn, K.M., Yonge, C.M. (Eds.), *Physiology of Mollusca*, vol. 2. Academic Press, New York, Physiology of Mollusca pp. 1 – 51.
- Paperna, I. (1980). *A. ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology. *Journal of Fish Diseases*, 3(5), pp. 363–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1980.tb00421.x>

- Paperna, I. (1983). Review of diseases of cultured warm-water marine fish. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer*, 182, pp. 44-48.
- Paperna, I. (1984). Reproduction cycle and tolerance to temperature and salinity of *A. ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 59(Ann. Parasitol. Hum. Comp. Volume 59, Number 1, 1984), pp. 7–30.
<https://doi.org/10.1051/parasite/1984591007>
- Paperna, I., & Baudin Laurencin, F. (1979). Parasitic infections of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and gilt head sea bream, *Sparus aurata*, in mariculture facilities in France. *Aquaculture*, 16(2), pp. 173–175. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(79\)90148-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(79)90148-0)
- Paperna, I.; Colorni, A.; Ross, B. & Colorni, B. (1981) Diseases of marine fish cultured in Eilat mariculture project based at the Gulf of Aqaba, Red Sea. *European Mariculture Society Special Publication* 6, pp. 81-91.
- Policarpo, P. K. (2017). *Faculdade de Medicina Veterinária Instituto Superior de Agronomia Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos: Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies* Patrícia Krus Policarpo DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA-PRODUÇÃO AN [Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária].
https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização%20Microbiológica%20de%20Bivalves%20Vivos_Efeito%20do%20Transporte%20e%20Variação%20Temporal%20Entre%20Espécies.pdf

- Reed, P. & Francis-Floyd, R. (1994). *Amyloodinium* Infections of Marine Fish. Em *University of Florida EDIS Publication* (English, Número Fact Sheet VM90). [Gainesville]: Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, [1994].
- Riesco MF, Félix F, Matias D, Joaquim S, Suquet M, Cabrita E. (2017). First study in cryopreserved *Crassostrea angulata* sperm. *Gen Comp Endocrinol*. 245: pp 108-115. Epub 2016 May 7. PMID: 27167499. <https://doi:10.1016/j.ygcen.2016.05.003>.
- Roberts-Thompson, A.; Barnes, A.; Fielder, D.S.; Robert J.G.; Adlard L. & Adlard, R.D. (2006). Aerosol dispersal of the fish pathogen, *A. ocellatum*. *Aquaculture*, pp. 257:118-123.
- Robinson, W. E. & Langton, R. W. (1980). Digestion in a subtidal population of *Mercenaria mercenaria* (Bivalvia). *Marine Biology*, 58(3), pp. 173–179. <https://doi.org/10.1007/BF00391873>
- Saraiva, A.; Jerónimo, D. & Cruz, C. (2011). *A. ocellatum* (Chromalveolata: Dinoflagellata) in farmed turbot. *Aquaculture*, 320(1–2), pp. 34–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.034>
- Silva, H. A., Costa, P. & Rodrigues, S. (2008). Morfologia, Biologia e Ecologia dos Moluscos Bivalves. In H. A. Silva e I. Baptista (Eds), *Produção, Salubridade e Comercialização de Moluscos Bivalves em Portugal*. (pp. 17-38). Lisboa: Publicações avulsas do IPIMAR

Smith, S. A.; Levy, M. G. & Noga, E. J. (1992). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to the parasitic dinoflagellate *A. ocellatum* in *Oreochromis aureus*. *Veterinary Parasitology*, 42 (1–2), pp. 145–155.
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90110-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90110-U)

Smith, Stephen A.; Levy, M. G. & Noga, E. J. (1994). Detection of anti-*A. ocellatum* antibody from cultured hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *m. chrysops*) during an epizootic of amyloodiniosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(1), pp. 79–81.
[https://doi.org/10.1577/15488667\(1994\)006<0079:CDOAAO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/15488667(1994)006<0079:CDOAAO>2.3.CO;2)

Smolowitz, R. & Shumway, S. E. (1997). Possible cytotoxic effects of the dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*, on juvenile bivalve molluscs. *Aquaculture International*, 5(4), pp. 291–300. <https://doi.org/10.1023/A:1018355905598>

Soares, F.; Quental-Ferreira, H.; Moreira, M.; Cunha, E.; Ribeiro, L. & Pousão-Ferreira, P. (2012). First report of *A. ocellatum* in farmed meagre (*Argyrosomus regius*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 32(1), pp. 30–33.

Soares, F.; Quental Ferreira, H.; Cunha, E. & Pousão-Ferreira, P. (2011). Aquaculture Europe 2012 - Securing our Future IMTA – Upscaling an ecosystem approach to farming the sea The importance of aquaculture for EU food production Pascal Divanach awarded EAS Honorary Life Membership. *Aquaculture Europe*, 36(4), pp. 4–12.

Soares, F.; Roque, A. & Gavaia, P. J. (2018). Review of the principal diseases affecting cultured meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture Research*, 49(4), pp. 1373–1382.

<https://doi.org/10.1111/are.13613>

Souza, N. (2014). *Resposta metabólica da ostra Crassostrea gigas na presença do parasita A. ocellatum*. Universidade do Algarve. pp. 1-23.

Southgate, P. (1993). Disease in Aquaculture. In: Aquaculture for veterinarians: *Fish husbandry and medicine* (Editor: Lydia Brown, L.A.) Pergamon Press, Oxford. pp. 91-129.

Tavares, J. (2017). *The importance of management factors for health in fish farming* [Universidade de Évora]. <http://hdl.handle.net/10174/22457>

Usheva, L. N.; Vaschenko, M. A. & Durkina, V. B. (2006). Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(3), pp. 166–172.
<https://doi.org/10.1134/S1063074006030047>

Villalba, A. Patología de moluscos bivalves (2002) In: Encontro brasileiro de patologistas de organismos aquáticos, 7; Encontro latino americano de patologistas de organismos aquáticos, 3., Foz do Iguaçu. Anais. Foz do Iguaçu: UEM.p.201.

Winstead, J.T. (1995). Digestive tubule atrophy in eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), exposed to salinity and starvation stress. *J. Shellfish Res.* 14, pp. 105 – 111.

Woo, P. T. K. (1996). Protective immune response of fish to parasitic flagellates. *Annual Review of Fish Diseases*, 6, pp. 121–131. [https://doi.org/10.1016/S09598030\(96\)90009-5](https://doi.org/10.1016/S09598030(96)90009-5)

Woo P. T. K. & Leatherland F. John. (2006). *Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections, 2nd Edition*. pp.37-38.
<https://books.google.pt/books?id=kMO8A4qkme0C&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q=doi&f=false>

Zambrano, J.L.F., D.E. Dezón, C.R. González & E.G. Fermín. (2001) Ciclo de vida de *A. ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellata: Oodiniidae). *Boletín Oceanográfico*, pp 83-89.

8. Apêndices e anexos

Índice

Anexo I - Técnica de recolha de amostra de muco da pele:	Erro! Marcador não definido.
Anexo II - Solução de Davidson.....	Erro! Marcador não definido.
Anexo III - Protocolo de coloração de histologia:	Erro! Marcador não definido.
Anexo IV - O protocolo do FastDNA™ Spin Kit for Soil utilizado na técnica molecular: ..	Erro! Marcador não definido.
Anexo V - Leitura dos resultados das amostras de histologia	Erro! Marcador não definido.
Anexo VI – Tabelas da classificação histológica das lesões identificadas nas ostras <i>Crassostrea gigas</i>:	Erro! Marcador não definido.

Anexo I - Técnica de recolha de amostra de muco da pele:

A fim de realizar uma biópsia do muco da pele, com uma lamela ou uma lâmina, passando com ela na parte de trás do peixe ou por baixo da barbatana peitoral. No caso de existirem anormalidades óbvias (ex: úlceras), é recomendado recolher a amostra na borda destas lesões, a menos que falemos de lesões como manchas brancas e nesse caso recolhemos do próprio local. A menos que o peixe se destine a ser sacrificado ou se tratar de uma necropsia, as amostras devem ser mínimas a fim de não originarmos lesões no peixe. Com o lado da lâmina/lamela onde se encontrar a amostra de muco, células e escamas colocamos uma gota de água (novamente pode ser com uma gota de água, do tanque do peixe) e está pronto a ser examinado ao microscópio. Em caso de recolha de pele, deve-se ter em conta que deve ser uma amostra que não cause lesões ao peixe (ex: ponta da barbatana caudal) com a ajuda de uma tesoura pequena e colocado em lâmina. Ter em conta que se o tecido estiver mais plano vai maximizar a visibilidade (Francis-Floyd & Floyd, 2011). Estes esfregaços de pele podem, para além de realizar o diagnóstico, serem úteis para observar lesões como hipersecreção de muco ou congestão do epitélio branquial (Ramos & Oliveira, 2001).

Técnica histológica: *A. ocellatum* pode também ser diagnosticado em amostras recolhidas para histologia durante uma necropsia. A técnica encontra-se aprofundada mais à frente, mas inicialmente os tecidos são colocados num fixador (ex: formol a 10%). Esta técnica é menos sensível do que a biópsia pois alguns parasitas podem soltar-se durante o processo, o que torna a técnica questionável em caso de resultados negativos (Francis-Floyd & Floyd, 2011; Paperna, 1980). Esta técnica permite observar lesões como hiperplasia do epitélio branquial ou edema dos tecidos lesionados pelo parasita, por vezes melhor do que a presença do mesmo, não que isso sirva de diagnóstico porque não é possível relacionar ambos (Ramos & Oliveira, 2001).

Técnica de recolha de amostra de biópsia de brânquia:

Quando se realiza uma recolha de tecido branquial para análise de rotina, o material de biópsia pode ser recolhido de peixes vivos por um método não-letal. Quando falamos de peixes vivos, é recomendado recolher a amostra antes de anestésiar o peixe, isto porque os anestésicos podem causar a separação do parasita do peixe (ex: MS-222, conhecido por sulfato de tricalina), levando a resultados falsos-negativos quando observado ao microscópio ótico. As amostras devem também ser examinadas o mais rápido possível porque podem perder valor de diagnóstico se começarem a secar (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

O peixe-alvo deve ser retido, colocando-o contra o lado do aquário ou sob uma superfície plana, húmida e não abrasiva. Cobrir/tapar os olhos ajuda a acalmar o peixe. Caso seja realizado o método não-letal, é crucial que só seja recolhida uma amostra mínima suficiente para diagnóstico. Nos casos em que o peixe é muito grande ou de difícil manuseamento, é recomendado o uso de contenção química (sedação ou anestesia). Por norma, é utilizado o MS-222 por ser eficaz e seguro em muitas espécies (Concentrações: 50 a 125 mg/l). Para realizar a biópsia, levanta-se, cuidadosamente, o opérculo do peixe e com uma pequena tesoura cortam-se alguns filamentos branquiais que são colocados numa lâmina de vidro. Adiciona-se uma gota de água (pode ser do aquário do peixe) e uma lamela por cima e a amostra está pronta a ser observada ao microscópio. Os trofontes são facilmente identificados ao microscópio (Francis-Floyd & Floyd, 2011; Ramos & Oliveira, 2001).

Anexo II - Solução de Davidson

Para 1 Litro (100%):

- 300 ml de água do mar filtrada – 30%
- 300 ml de etanol absoluto (96%) – 30%
- 100 ml de Glicerol/Glicerina – 10%
- 200 ml de Formol comercial (37-40%) – 20%
- 100 ml de ácido acético – 10%

O ácido acético é adicionado somente no dia da utilização devido à instabilidade (reação) causada à solução a longo prazo

Anexo III - Protocolo de coloração de histologia:

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

Anexo IV - O protocolo do FastDNA™ Spin Kit for Soil utilizado na técnica molecular:

1. Adicionar até 500 mg da amostra ao tubo Lysing Matrix E
2. Adicionar 978 µL de tampão de fosfato de sódio à amostra do tubo Lysing Matrix E
3. Adicionar 122 µL de tampão MT
4. Homogeneizar num agitador FastPrep por 40 segundos
5. Centrifugar a 14.000 x g por 5-10 minutos para sedimentar resíduos celulares
6. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo de microcentrifugação. Adicionar 250 µL de PPS (Protein Precipitation Solution/ Solução de precipitação proteica)
7. Centrifugar a 14.000 x g por 5 minutos para os resíduos precipitarem. Transferir o sobrenadante para um tubo de 15 ml limpo
8. Ressuspender a suspensão da matriz de ligação (Binding matrix suspension) e adicionar 1.0 ml ao sobrenadante num tubo de 15 ml
9. Colocar no rotador ou inverter manualmente por 2 minutos para permitir a ligação do DNA. Colocar um tubo num suporte por 10 minutos e permitir que a matriz sílica assente
10. Remover e descartar 500 µL do sobrenadante, sendo gentil para evitar a matriz de ligação já
11. Ressuspender a matriz de ligação gentilmente na quantidade restante de sobrenadante. Transferir aproximadamente 600 µL da mistura para o Spin™ Filter e centrifugar a 14.000 x g por 1 minuto. Esvaziar o tubo de captura e adicionar o resto da mistura para o Spin™ Filter e centrifugar como antes. Esvaziar o tubo de captura novamente
12. Adicionar 500 µL do preparado SEWS-M e gentilmente ressuspender o sedimento usando a força do líquido da ponta da pipeta
13. Centrifugar a 14.000 x g por 1 minuto. Esvaziar o tubo de captura e repor
14. Sem a adição de quaisquer líquido, centrifugar uma segunda vez a 14.000 x g por 2 minutos para “secar” a matriz da solução residual limpa. Descartar o tubo de captura e repor com um novo
15. Deixar o Spin™ Filter secar por 5 minutos à temperatura da sala
16. Suspender gentilmente a matriz de ligação (por cima do Spin™ Filter) em 50-100 µL de DES (DNase/Pyrogen-Free Water)

17. Centrifugar a 14.000 x g por 1 minuto para trazer o DNA eluído para o tubo de captura. Descartar o SpinTM Filter. O DNA está agora preparado para PCR e aplicações “por ai em diante”. Armazenar a -20°C por períodos extensos ou a 4°C até próxima utilização

Anexo V - Leitura dos resultados das amostras de histologia

Todos os resultados foram tabelados de 0 a 5, onde:

- Na dispersão de uma lesão, 0 representa que a mesma não foi encontrada na amostra (0%) e 5 foi identificada em 100% da mesma. (por exemplo: se o valor for 3, significa que se encontrava presente em 60% da amostra).
- Na intensidade de uma lesão, onde:
 - 0 representa que a mesma foi nula
 - 1 encontrada de forma suave/discreta
 - 2 encontrada de forma visível
 - 3 encontrada de forma evidente
 - 4 encontrada de forma muito evidente
 - 5 extremamente evidente

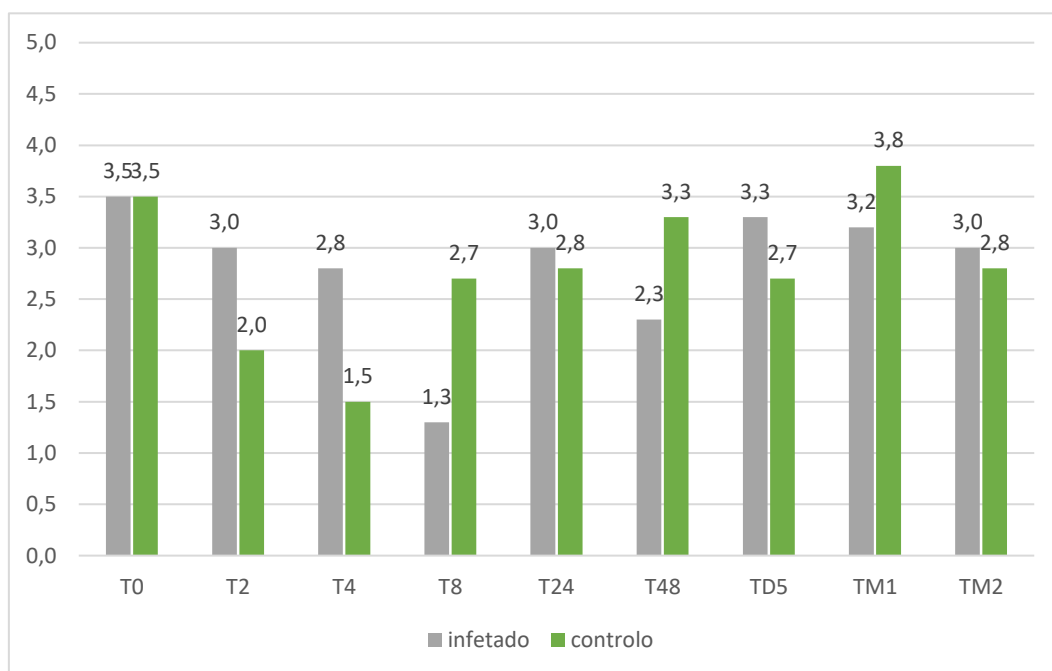
Todas os sinais de lesão observados nas brânquias e trato digestivo foram identificados do início ao fim do ensaio, demonstrando que estiveram sempre presentes, tanto no grupo controle, como no grupo infectado.

Nas observações da dispersão das lesões notou-se que às em T4 (4 horas) e T8 (8 horas) apresentaram maior número de variações de valores e que nas observações da intensidade das lesões se verificou um maior número de variações em T4, em ambos os grupos (controle e infectado)

Brânquias

1 - Hiperplasia epitelial

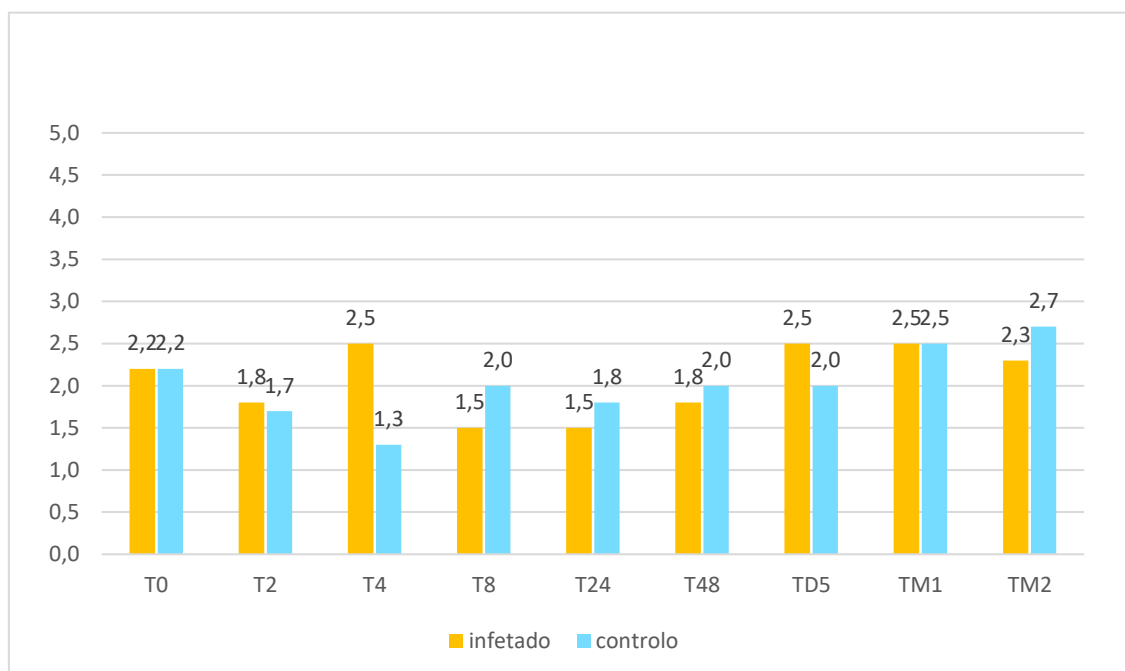
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou valores pouco variáveis na dispersão de hiperplasia epitelial durante o ensaio, dando a ideia de que esta lesão não apresentou evolução durante o ensaio, apesar de sempre presente, mantendo-se em valores entre 2,3 e 3,3, com pequenas variações, exceto em T8 onde o valor foi de 1,3. No grupo das ostras de controle, os valores foram próximos dos valores encontrados no grupo infetado, entre 2,7 e 3,8, mas este grupo apresentou uma depressão evidente em T2 e T4 com valores de 2,0 e 1,5 respetivamente. A média de controle e do grupo infetado foi de 2,8 (56%), dando assim para afirmar que foi uma lesão detetada com relativa frequência, abrangendo mais de metade dos tecidos observados. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

- Intensidade

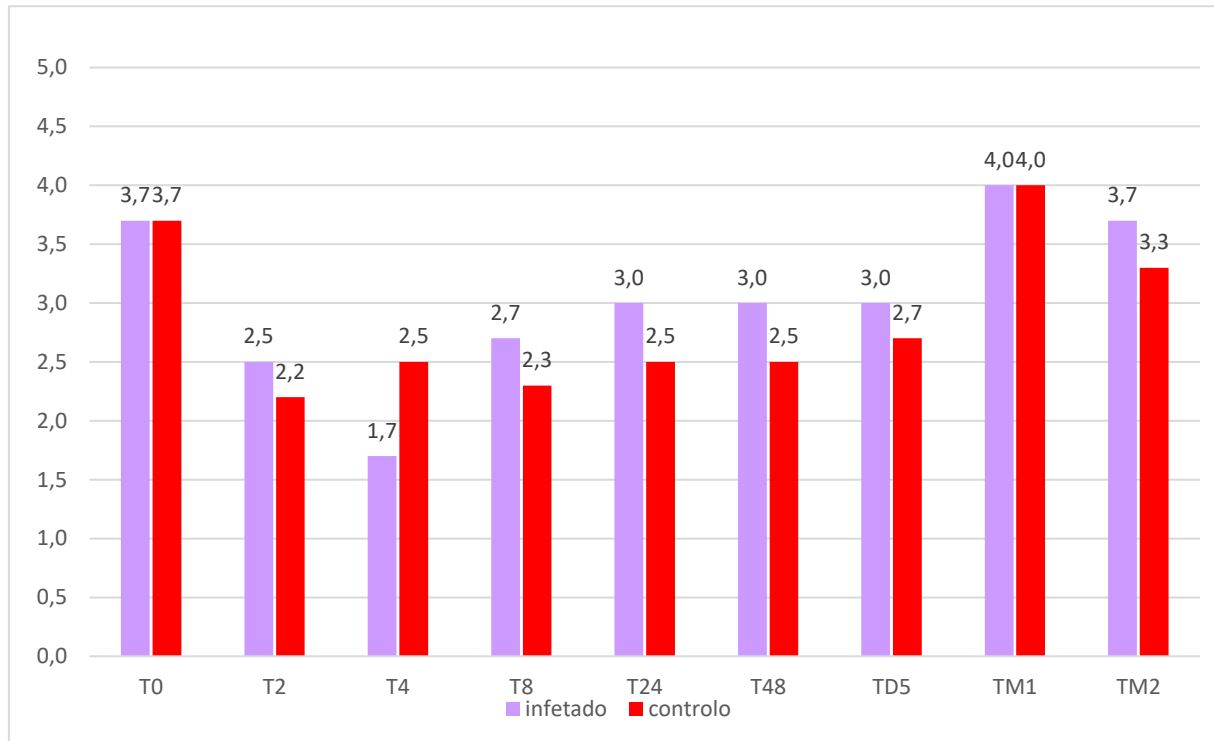


Observações:

O grupo infetado apresentou valores entre 1,5 e 2,5 na intensidade de hiperplasia epitelial durante o ensaio, com pequenas variações entre si. O grupo controle também apresentou valores com pouca ou nenhuma evolução desta lesão ao longo do ensaio, dando a entender que não existiu uma evolução da sua intensidade. Os valores oscilaram entre 1,7 e 2,7. A média do grupo controle foi de 2,0 e do grupo infetado foi 2,1, concluindo que foi uma lesão que se manifestou de forma visível em ambas as populações, apesar de nunca o fazer de forma exuberante. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

2 - Hiperplasia das células de muco

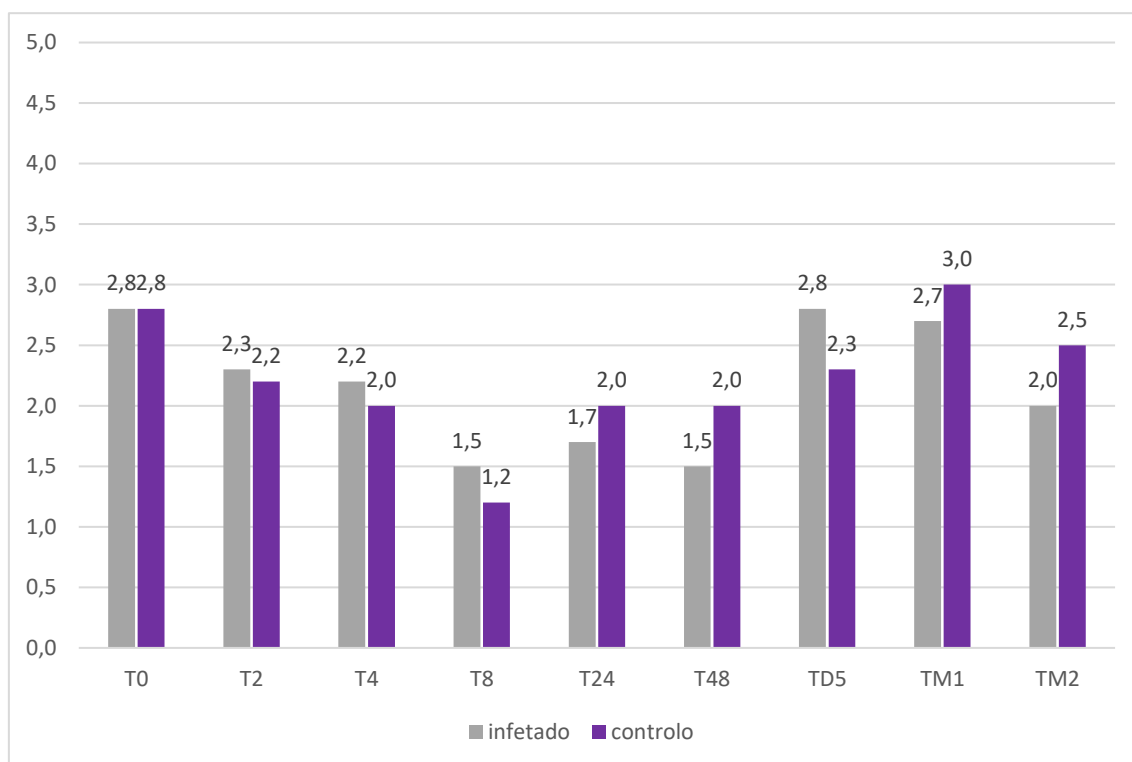
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou uma evolução lenta na dispersão da hiperplasia das células de muco durante o ensaio, evoluindo de 3,7 (T0), descendo 2,5 e voltando para 3,7 gradualmente, apresentando um pico de 4,0 em TM1 e um declínio em T4 de 1,7. O grupo das ostras controle apresentou valores muito semelhantes entre si durante o ensaio com valores entre 2,2 e 2,7, com exceção das extremidades (T0, TM1 e TM2) cujo os valores se encontram entre 3,3 e 4,0, não apresentando, portanto, uma evolução da dispersão da lesão. A média do grupo controle foi de 2,9 (58%) e do grupo infetado foi 3,0 (60%), levando a concluir que foi uma lesão encontrada com frequência, abrangendo cerca de 60% dos tecidos observados. Apesar da evolução de ambos ser ligeiramente diferente, os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

- Intensidade

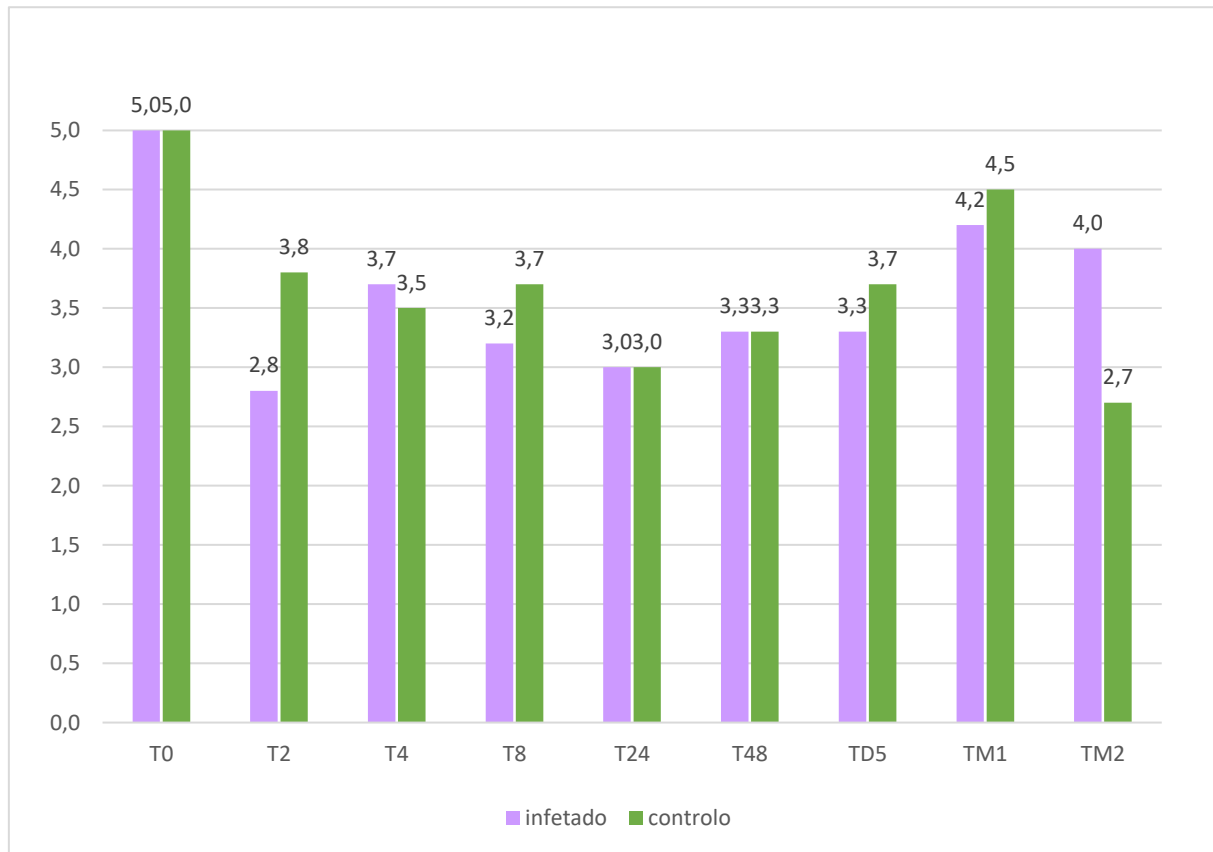


Observações:

O grupo infetado apresentou valores pouco variáveis na intensidade de hiperplasia epitelial durante o ensaio, entre 2,0 e 2,8, com um declínio entre T8 e T48 onde os valores se encontram entre 1,5 e 1,7, sem uma evolução aparente durante todo o ensaio. O grupo controle também apresentou valores regulares, com valores entre 2,0 e 3,0, apresentando também um declínio em T8 onde os resultados foram de 1,2 valores. A média do grupo controle e do grupo infetado foram de 2,2, concluindo que foi uma lesão que se manifestou de forma visível em ambas as populações. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

3 - Hiperplasia das células granulares

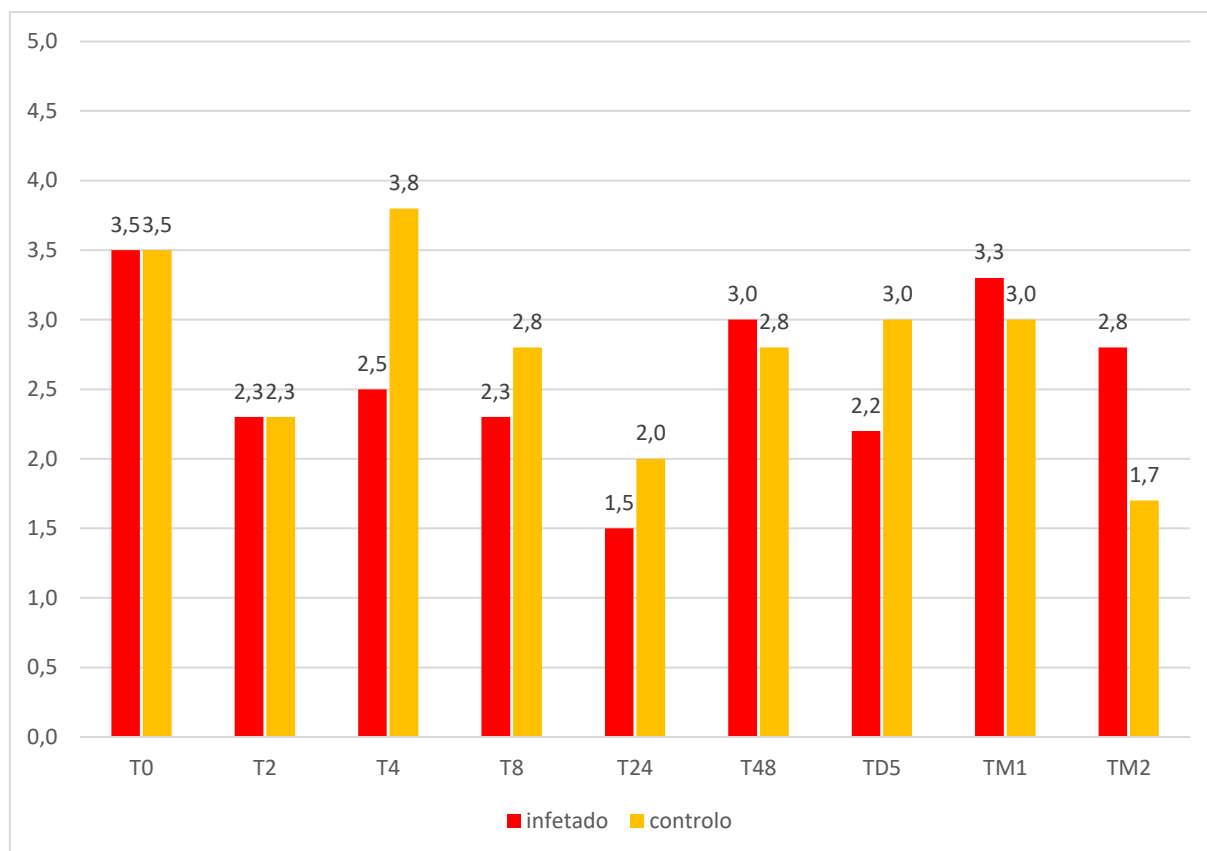
- Dispersão



Observações:

Apesar de ambos os grupos terem começado com 5,0 (T0), o grupo infetado apresentou na sua maioria valores pouco variáveis na dispersão da hiperplasia das células granulares, com a maioria dos seus valores entre 3,0 e 3,7, tendo apenas um 2,8 em T2 e valores de 4,2 e 4,0 em TM1 e TM2 respetivamente. O grupo controlo apresentou uma oscilação maior dos seus valores comparativamente ao grupo infetado, começando com uma lâmina em T0 com 5 valores (100%), estabilizando depois entre 3,0 e 3,7 e voltando a subir em TM1 com 4,5 e TM2 com 2,7. A média do grupo controlo foi de 3,7 e do grupo infetado foi de 3,6, levando a concluir que abrangem 74% e 72% das amostras respetivamente. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controlo e infetado.

- Intensidade

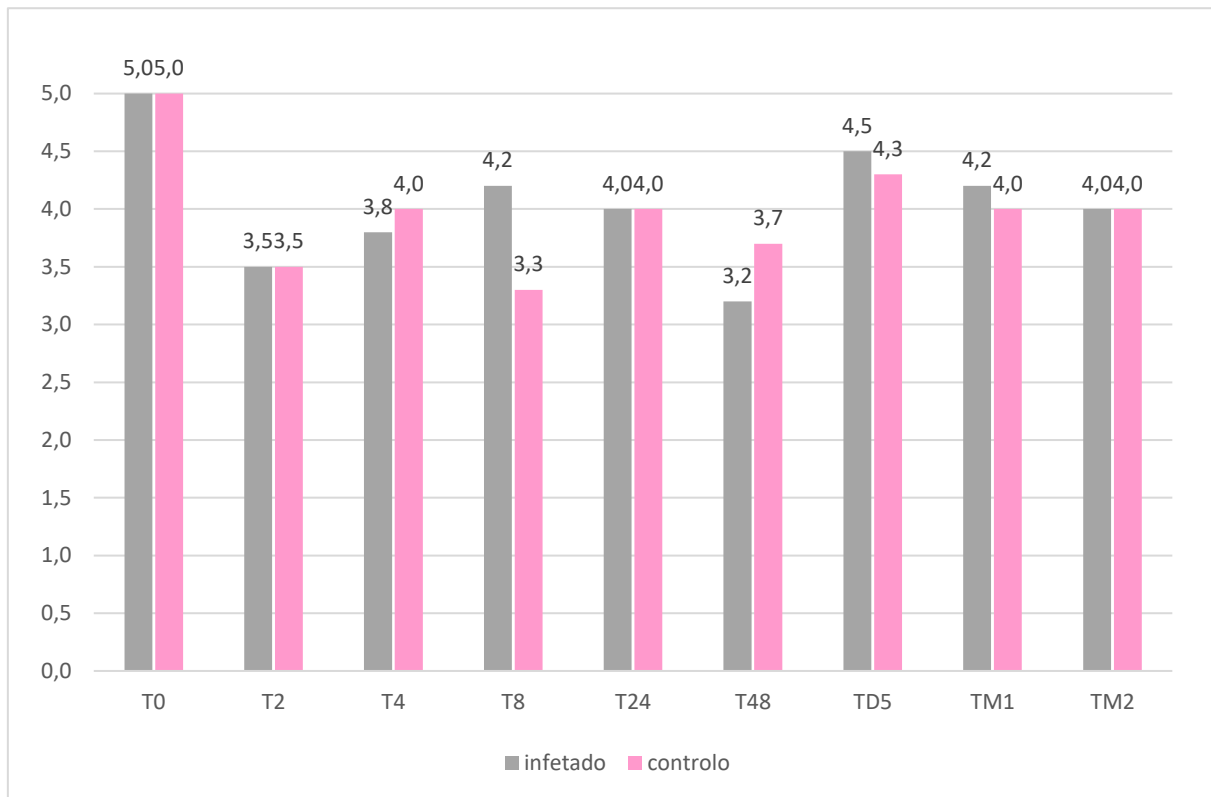


Observações:

O grupo infetado apresentou valores contidos entre 1,5 e 3,5 na intensidade da hiperplasia das células granulares, apresentando valores mais baixos em T24. O grupo controle também apresentou valores entre 1,7 e 3,0, com exceção no início do ensaio (T0) com 3,5 e em T4 com 3,8 valores, relativamente a esta lesão. A média do grupo controle foi de 2,8 e do grupo infetado foi 2,6. Esta lesão manifestou-se entre visível e evidente sendo uma lesão com oscilações significativas ao longo de todo o ensaio. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controle e infetado.

4 - Infiltração dos hemócitos

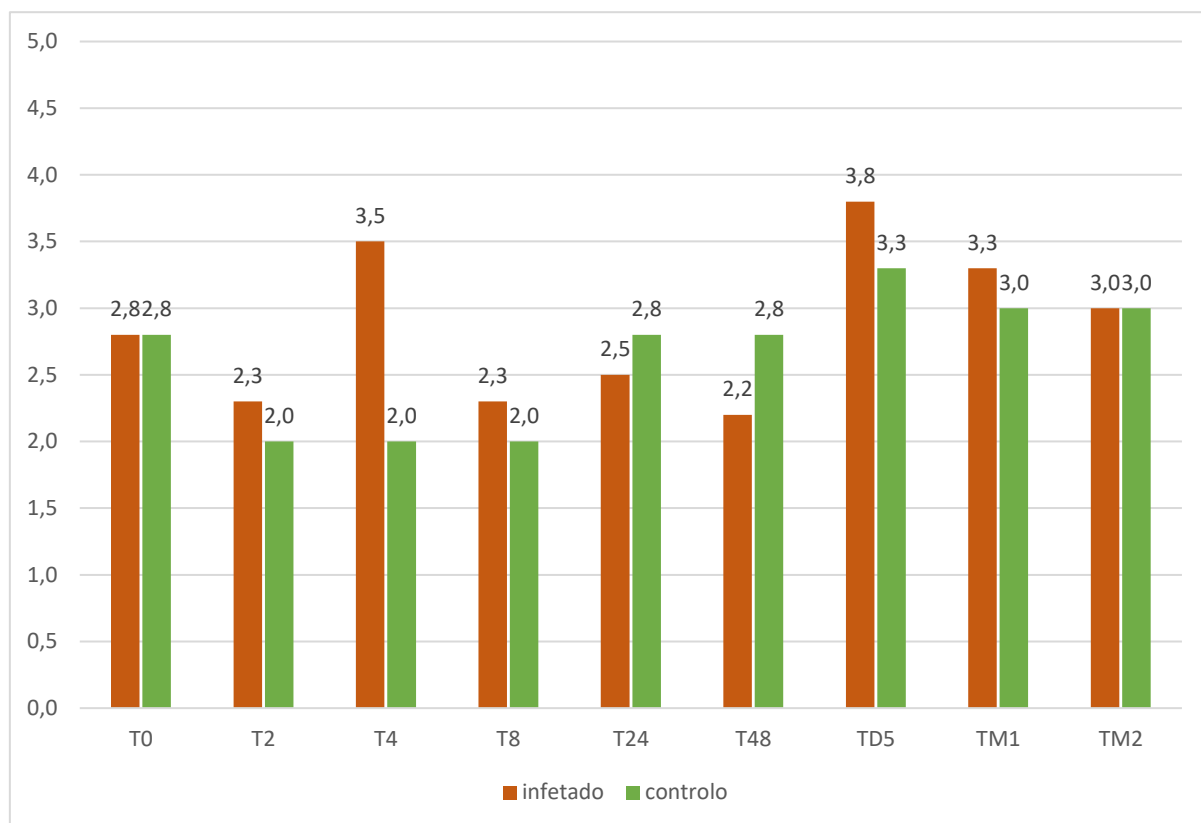
- Dispersão



Observações:

Apesar de o início ter sido uma dispersão de 5,0 (100%) para ambos os grupos, o grupo infetado apresentou valores comprimidos entre 3,2 e 4,5 na dispersão da infiltração de hemócitos e o grupo controle apresentou entre 3,3 e 4,3. A média do grupo controle e no grupo infetado foi de 4,0, o que se traduz em cerca de 80% das amostras observadas apresentarem este sinal de infecção, significando que foi encontrada em praticamente todo o tecido observado. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

- Intensidade

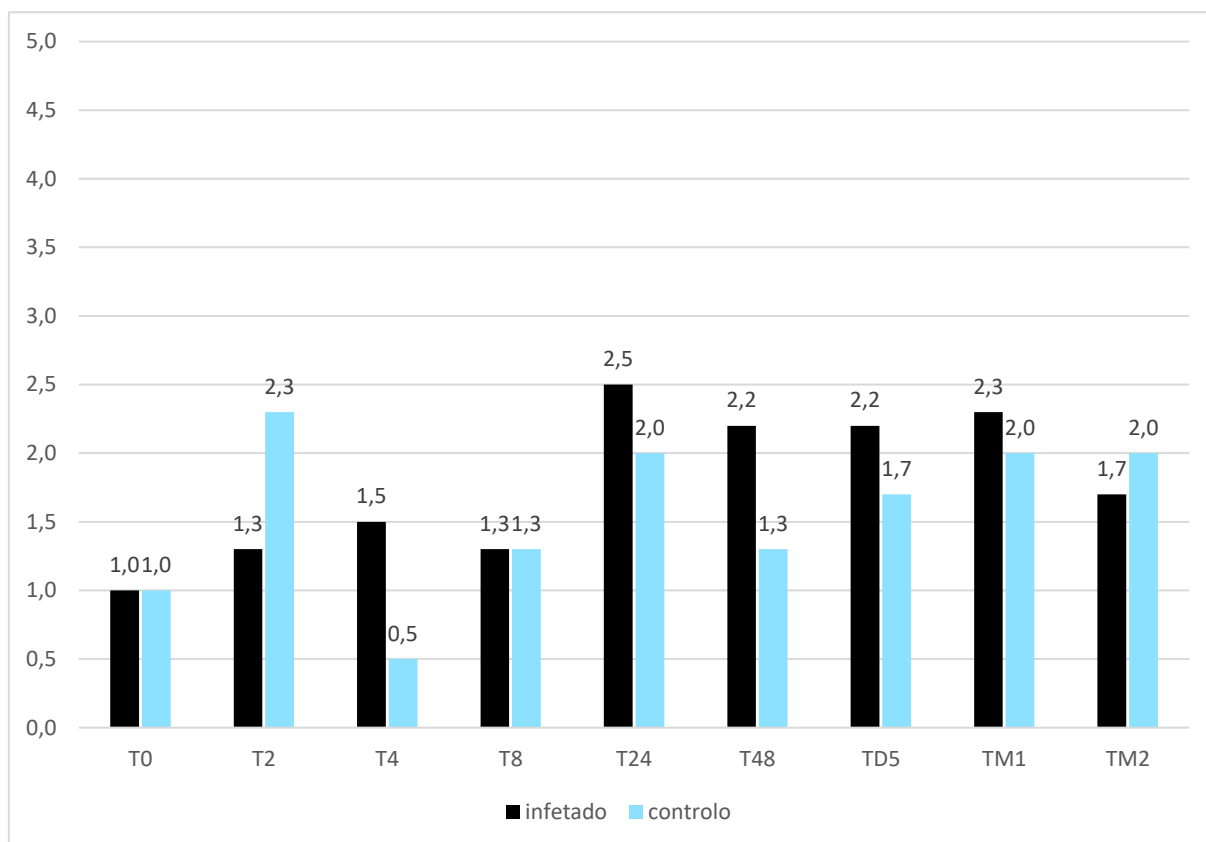


Observações:

O grupo infetado apresentou valores entre 2,2 e 3,8 na intensidade da infiltração dos hemócitos, sendo os T4 e TD5 os grandes picos com 3,5 e 3,8 respetivamente. A segunda metade dos resultados apresenta valores mais elevados com maior frequência, levando a acreditar que houve uma ligeira evolução na intensidade da infiltração dos hemócitos. No grupo controlo os valores variaram menos, apresentando valores entre 2,8 e 3,3. A média do grupo controlo foi de 2,6 e do grupo infetado de 2,9 valores, concluindo que foi uma lesão que se manifestou de forma evidente. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controlo e infetado.

5 - Necrose

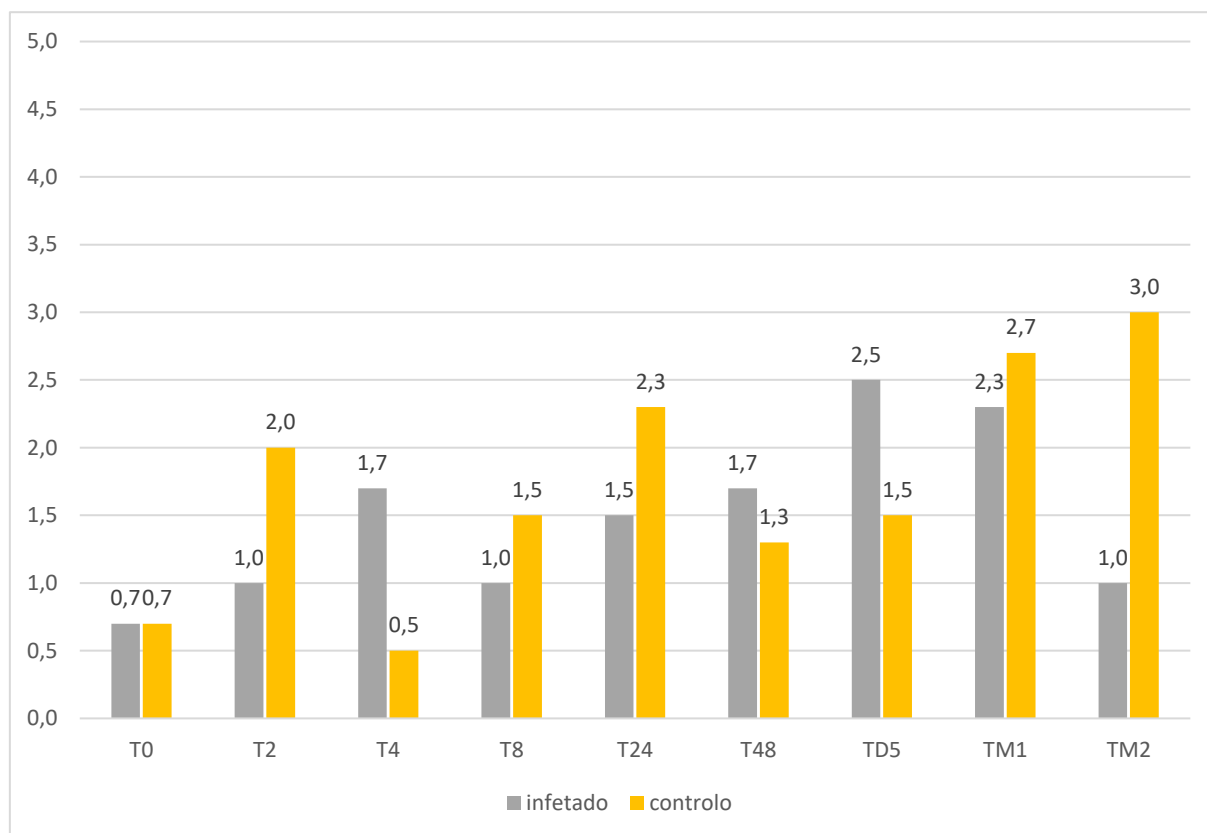
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou uma evolução notória de necrose até às 24 horas do ensaio (T24), evoluindo de 1,0 para 2,5, mantendo-se nestes valores no resto do ensaio, significando que a presença de necrose nos tecidos foi encontrada em praticamente 50% dos tecidos observados após as primeiras 24 horas. O grupo controlo demonstrou também que a necrose esteve sempre presente, apesar de os valores serem ligeiramente inferiores aos dos infetados. No início do ensaio, o controlo apresentava 1 valor de necrose (20% do tecido), seguido de 1 pico em T2 com 2,3 valores e uma recaída em T4 para 0,5. Depois disso, apresentou valores bastante estáveis entre 1,3 e 2,0, ou seja, 26% a 40% do tecido apresentava necrose. A média do grupo controlo é de 1,6 e do grupo infetado de 1,8, o que se traduz em 32% e 36% do tecido com sinais de necrose respetivamente. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controlo e infetado.

- Intensidade

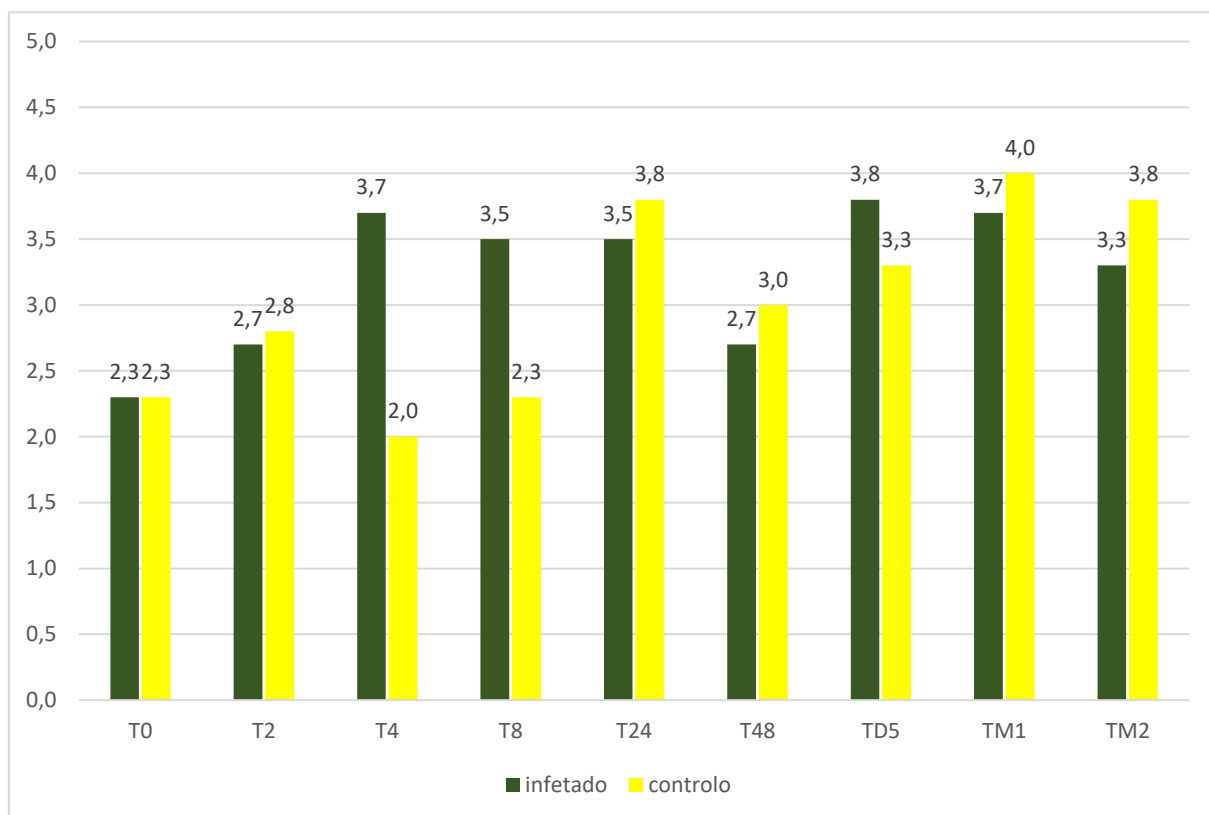


Observações:

O grupo infetado apresentou valores de necrose entre 0,7 e 2,5, manifestando altos e baixos ao longo de todo o ensaio, sem uma ordem coerente, levando a acreditar que foi uma lesão sem uma evolução coesa. O grupo controle apresentou valores também eles com uma evolução irregular, mas crescente ao longo do ensaio, com valores entre 0,5 e 3,0, sendo que na 2ª metade do ensaio apresenta valores mais elevados com maior frequência. A média do grupo controle foi de 1,7 e do grupo infetado foi de 1,5, sendo visível a intensidade da necrose encontrada, embora discreta quando comparada com os outros sinais de lesão aqui mencionados. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

6 - Erosão

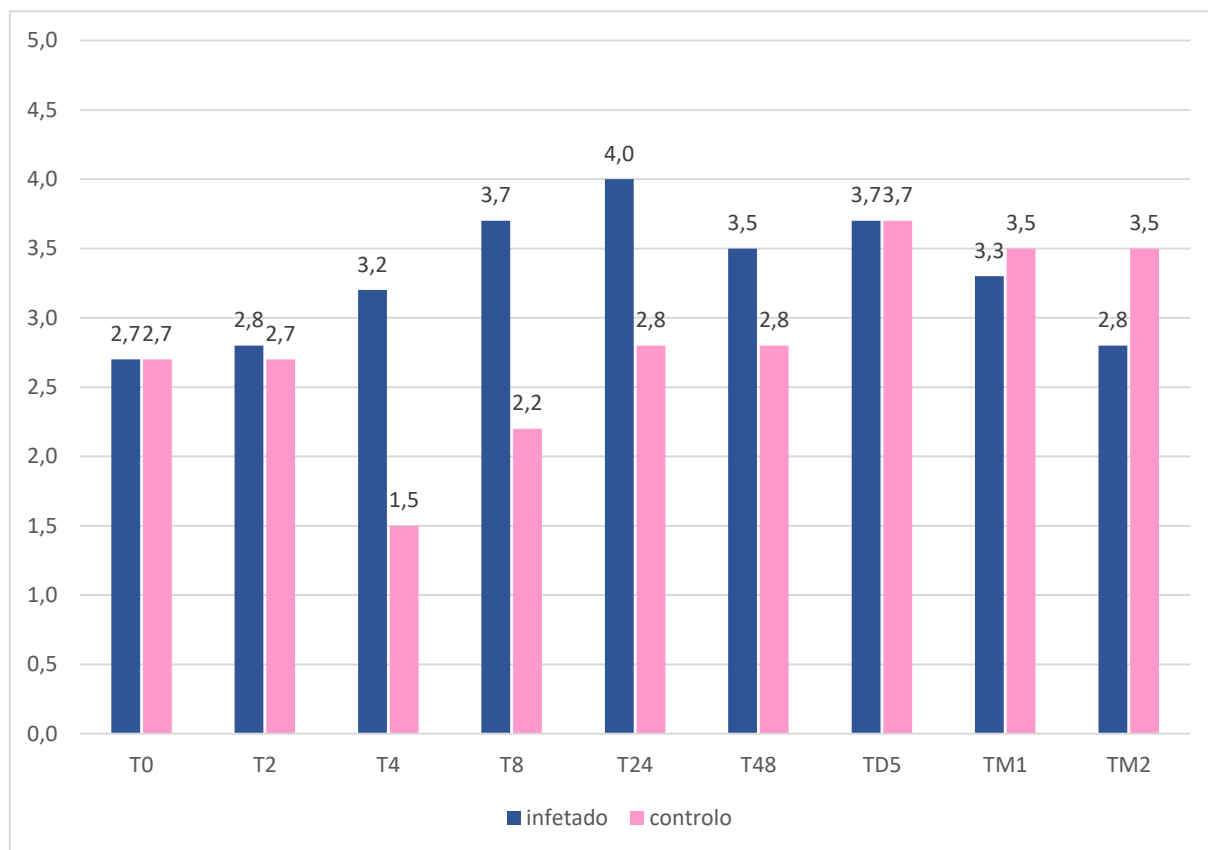
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou valores de erosão que foram entre 2,3 e 3,8, distribuídos de forma bastante equilibrada durante todo o ensaio, não demonstrando uma evolução coerente e o grupo controlo apresentou valores entre 2,0 e 4,0. Neste caso, os valores mais baixos encontram-se no início do ensaio e os mais altos no final, demonstrando uma evolução da erosão com o passar do tempo. A média do grupo controlo foi de 3,0 e no grupo infetado foi de 3,2, o que representa 60% e 64% respetivamente. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controlo e infetado.

- Intensidade



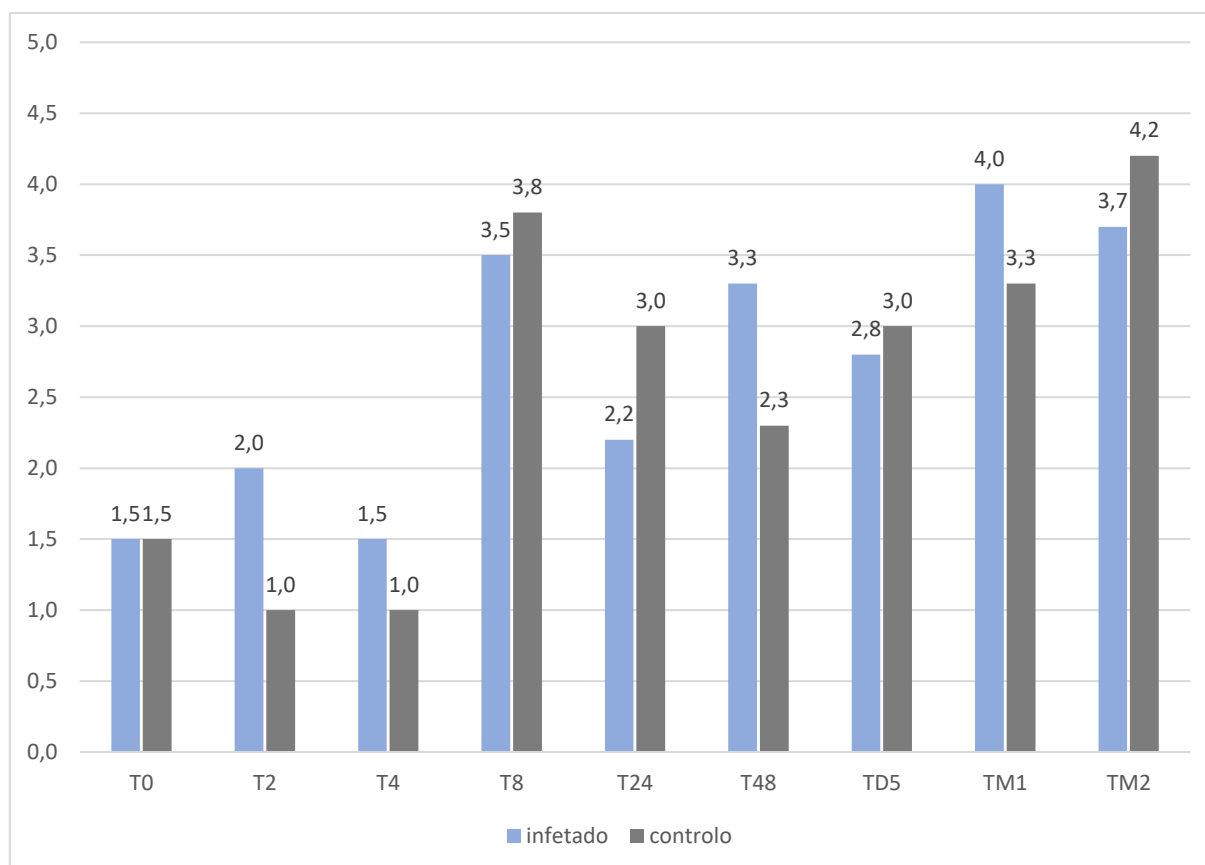
Observações:

O grupo infetado apresentou valores de erosão entre 2,7 e 4,0, apresentando os valores mais elevados no centro e os mais baixos nas extremidades. O grupo controle apresentou valores entre 2,7 e 3,7, com exceção de T4 e T8 onde os valores foram inferiores, apresentando 1,5 e 2,2 respetivamente. Apesar dos valores mais altos serem no final do ensaio, não existe uma evolução coerente com este sinal de lesão, estando esta presente do início ao fim. A média do grupo controle foi de 2,8 valores e do grupo infetado foi de 3,3 valores, levando a concluir que foi uma lesão que se manifestou de forma evidente ao longo do ensaio. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

Trato digestivo

1 - Hemócitos – infiltração

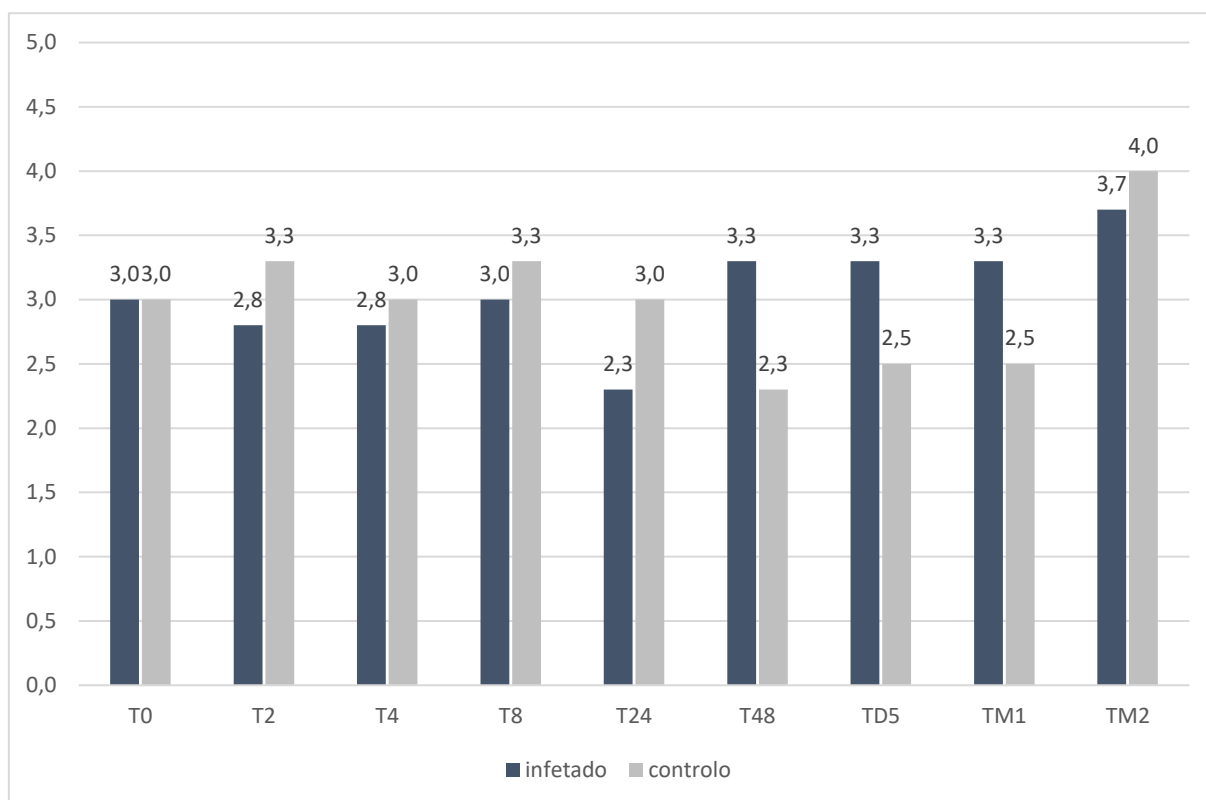
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou uma evolução crescente de valores da infiltração de hemócitos, começando em 1,5 (T2) e terminando em 3,7 em TM2, apesar de T4 apresentar de os valores oscilarem em T4 (1,5), T8 (3,5) e T24 (2,2), distorcendo um pouco a leitura, mas é notório que a segunda metade do gráfico apresenta valores mais elevados que a primeira metade e de forma crescente. Apesar de algumas diferenças, o grupo controlo apresentou valores semelhantes do grupo infetado, entre 1,5 e 4,2, manifestando valores mais elevados no fim do ensaio e em T8 (3,8). A média do grupo controlo é de 2,6 (52%) e do grupo infetado de 2,7 (54%), levando a afirmar que pelo menos metade das amostras apresentavam esta lesão. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controlo e infetado.

- Intensidade

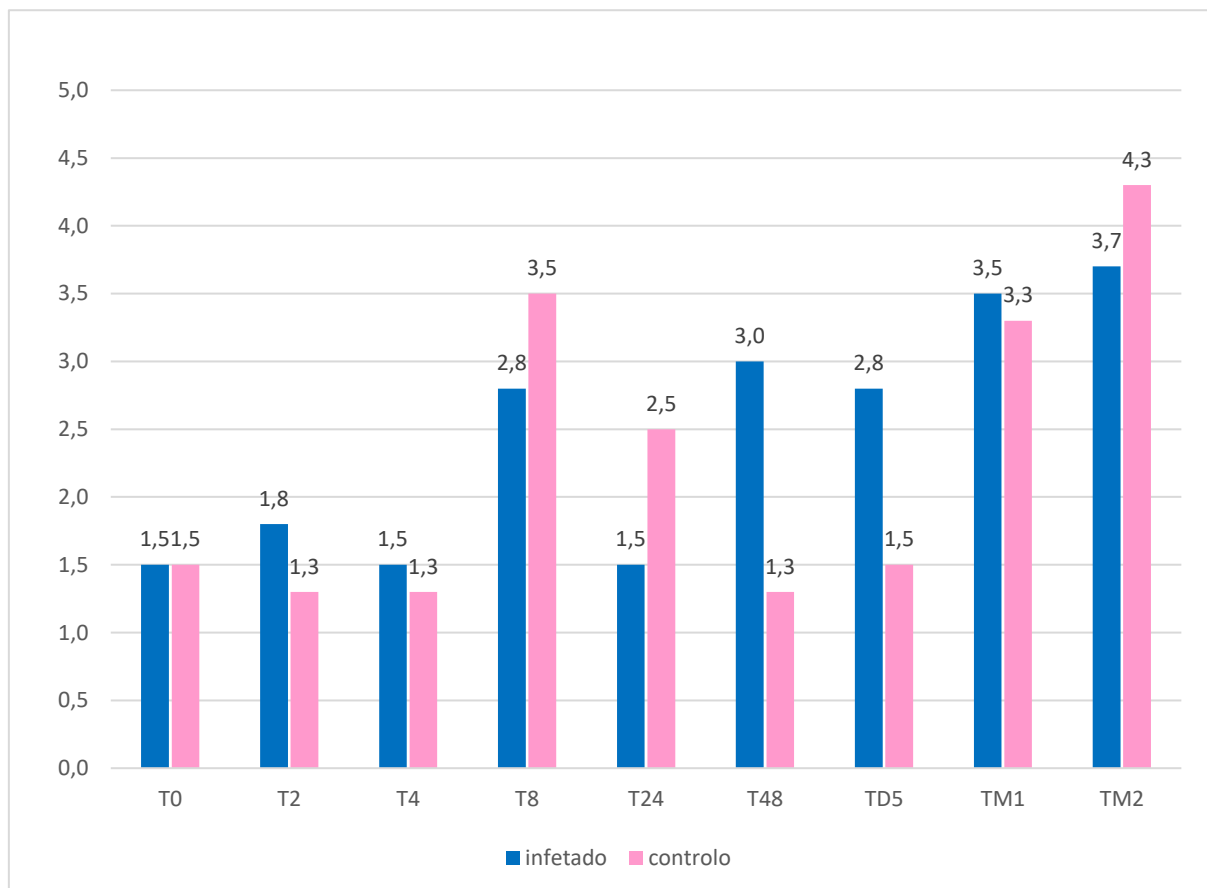


Observações:

O grupo infetado apresentou valores de infiltração de hemócitos entre 2,3 e 3,7, mas sendo muito regular entre 2,8 e 3,3, existindo apenas uma ligeira descida em T24 com 2,3 e TM2 com 3,7 valores. O grupo controle apresentou valores entre 2,3 e 4,0 mas apesar da discrepância dos mesmos, os valores da primeira metade são todos eles entre 3,0 e 3,3 e apenas na segunda metade se observa uma descida de valores para 2,3 até ao valores final onde se observa um pico de 4,0. Em ambos os grupos não se verifica uma evolução da lesão mas sim que esta se manteve constante e presente, sem aumentar a sua intensidade. A média do grupo controle foi de 3,0 e do grupo infetado de 3,1, levando a concluir que foi uma lesão que se manifestou de forma evidente ao longo do ensaio. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controle e infetado.

2 - Hemócitos – agregados

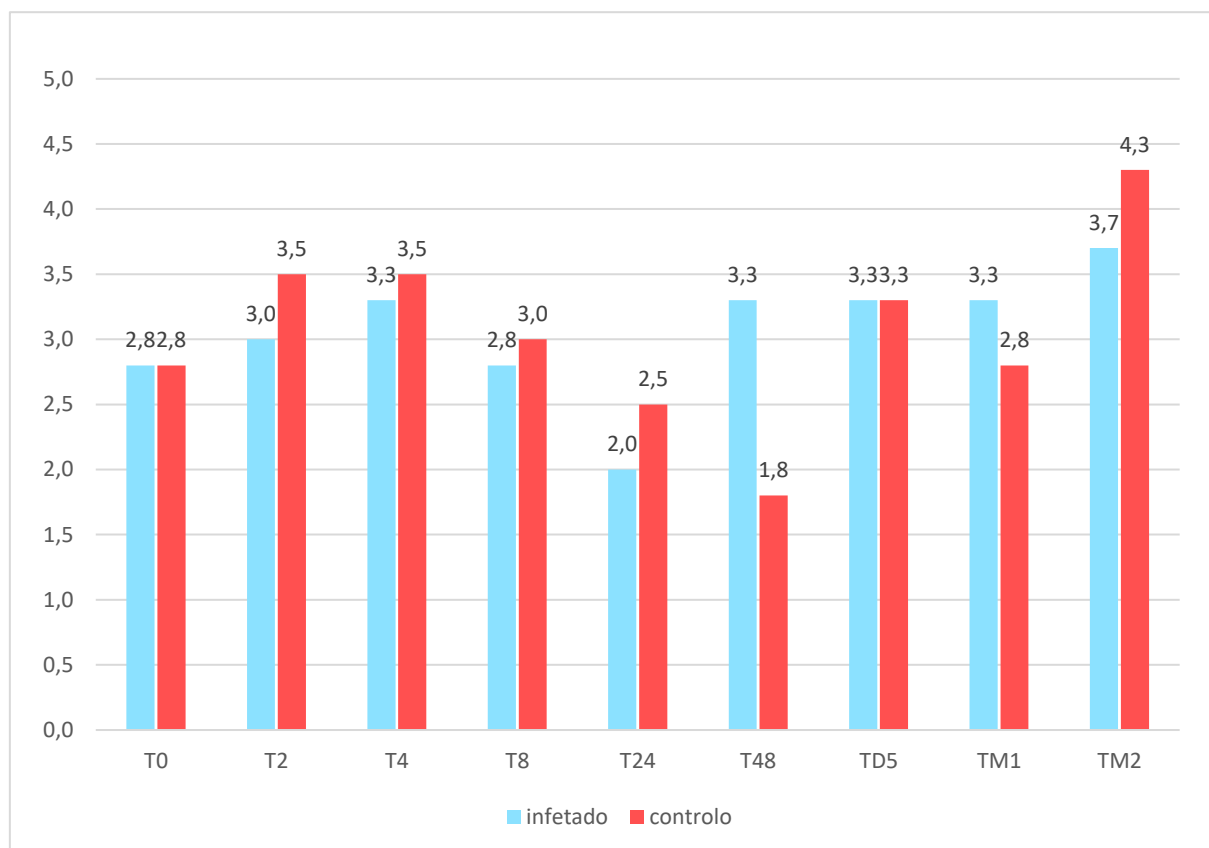
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou um leque de valores bastante afastado de agregados de hemócitos, entre 1,5 e 3,7, mas os valores mais elevados encontram-se na segunda metade do ensaio, apesar de T8 apresentar o dobro de T24 com 2,8 e 1,5 respetivamente. O grupo controlo também apresentou um leque de valores elevado com 1,3 e 4,3, sendo que os valores predominantes foram entre 1,3 e 1,5, com um pico em T8 com 3,5 e TM1 e TM2 com 3,3 e 4,3 respetivamente. A média do grupo controlo foi de 2,3 (46%) valores e do grupo infetado foi de 2,5 (50%) valores, portanto cerca de metade das amostras apresentavam este sinal de lesão. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controlo e infetado.

- Intensidade

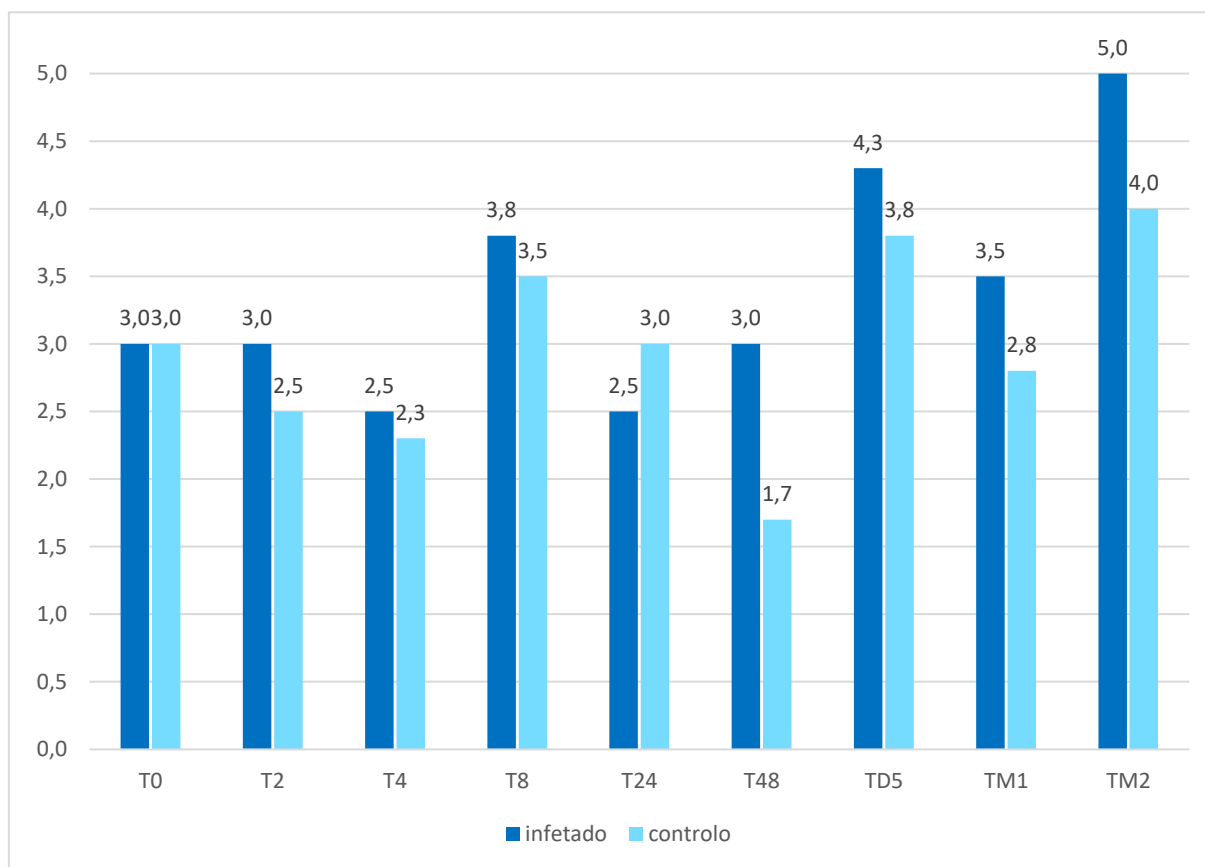


Observações:

O grupo infetado apresentou valores agregados de hemócitos entre 2,8 e 3,7, com exceção de T24 com 2,0 valores. O grupo controle apresentou valores entre 2,5 e 3,5, com exceção de T48 com 1,8 e TM2 com 4,3 valores. Ambos os grupos não apresentaram uma evolução desta lesão ao longo do ensaio, apresentando algumas oscilações, mas sem significado aparente. Ambos os grupos apresentaram uma média de 3,1 valores, o que sugere que a lesão foi visível na sua manifestação. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

3 - Enterite

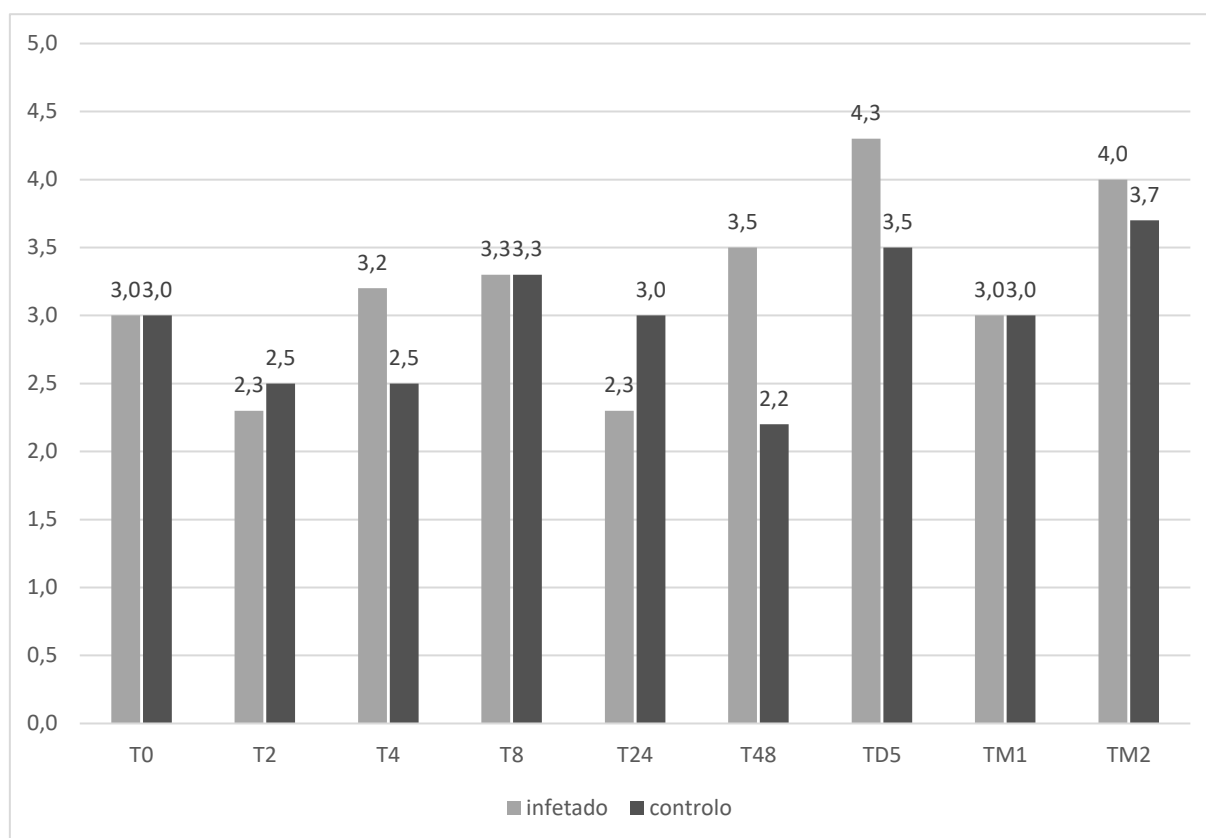
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou valores com altos e baixos de enterite ao longo do ensaio passando por 2,5 e 5,0 valores. Apesar de os valores mais elevados se concentrarem a partir de TD5, encontramos em T8 3,8 valores. No grupo controle, os valores foram mais homogêneos, situando-se próximos dos 3,0 valores, embora encontremos alguns resultados entre 1,7 e 4,0. Ambos os grupos apresentam uma evolução ligeiramente diferente, sendo que o grupo infetado teve uma evolução crescente dos valores e o grupo controle não apresentou evolução significativa ao longo do ensaio. A média do grupo de controle é de 3,0 valores (60%) e de infetados de 3,4 valores (68%), apresentando-se, assim, sinais de lesão em cerca de 2 terços das amostras. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

- Intensidade

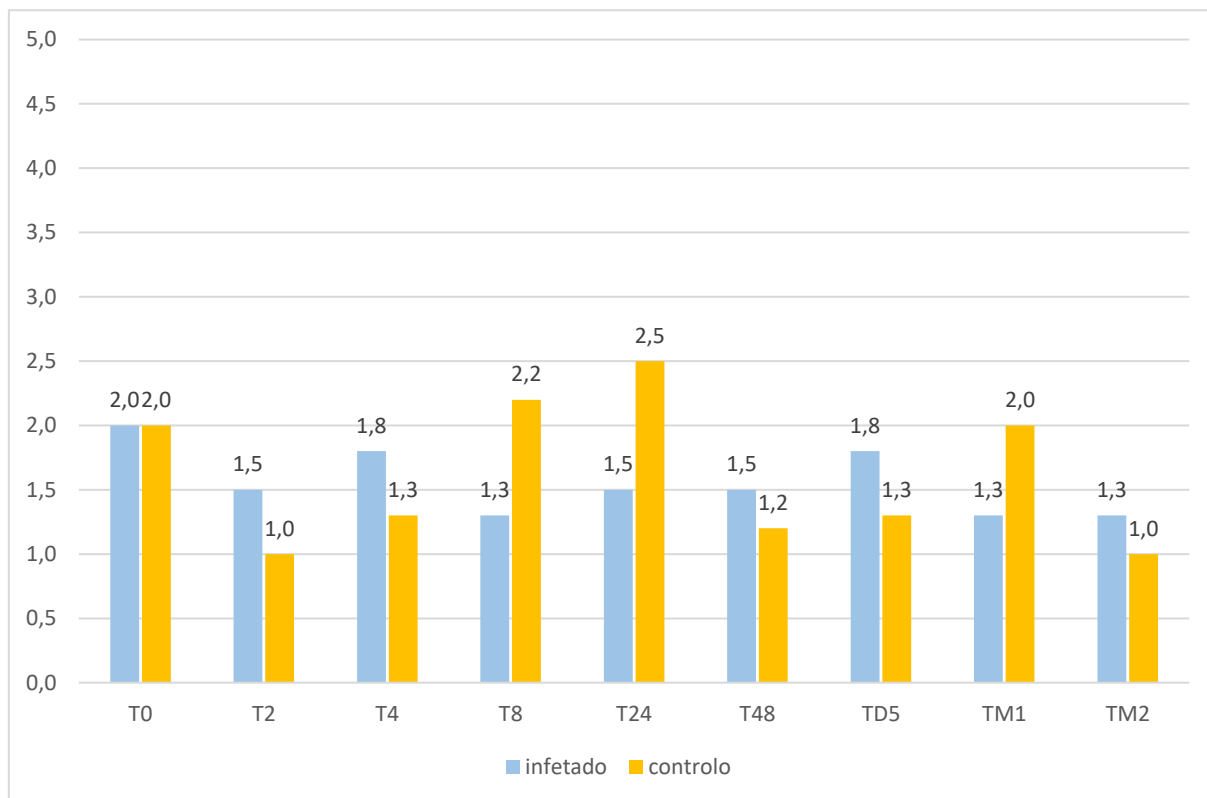


Observações:

O grupo infetado apresentou valores de enterite entre 2,3 e 4,3 valores e o grupo controle com valores entre 2,2 e 3,7 valores. Ambos os grupos não demonstram evolução nesta lesão, apesar de um ligeiro crescimento de valores no grupo infetado pouco relevante. A média do grupo de controle é de 3,0 e infetados de 3,2 valores, o que sugere que a lesão foi evidente na sua manifestação. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

4 - Fusão lamelar

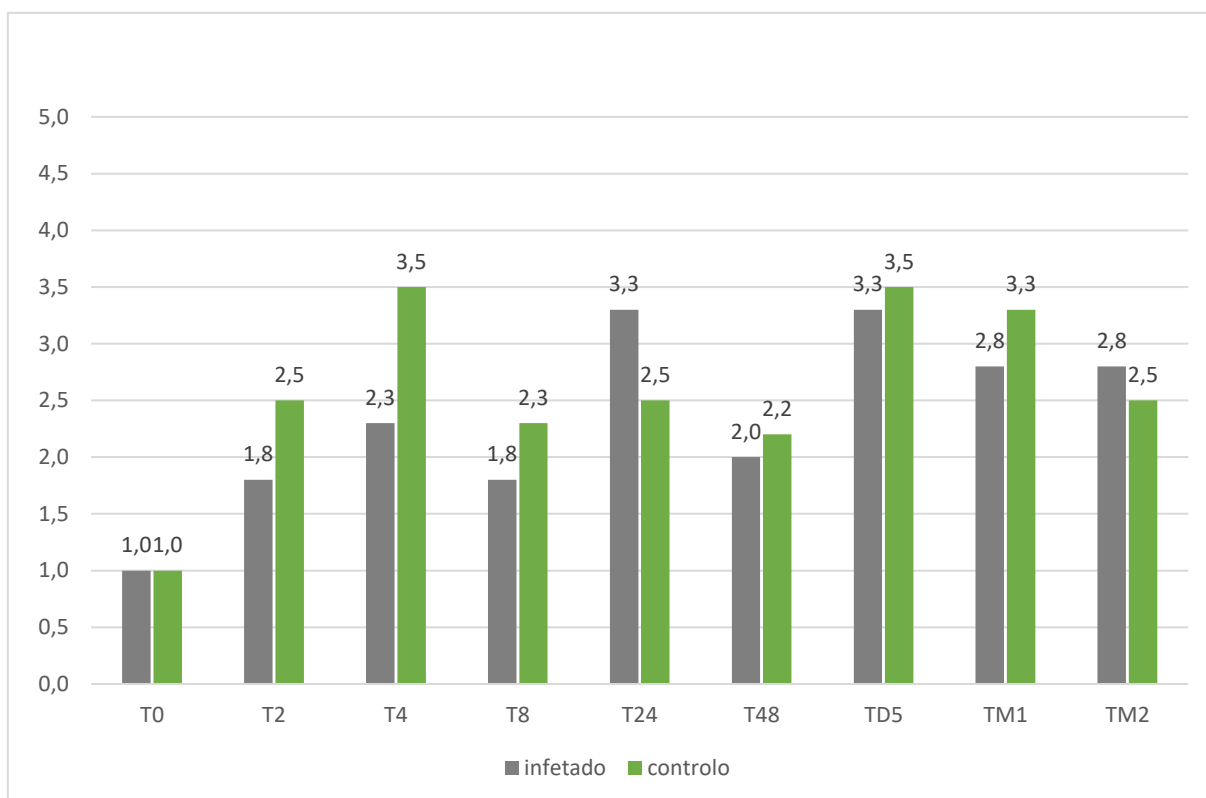
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou valores de fusão lamelar entre 1,3 e 2,0, mantendo-se equilibrado ao longo de todo o ensaio, enquanto que o grupo controle apresentou valores com mais variação entre 1,0 e 2,5. A média do grupo controle e do grupo infetado foi de 1,6 (32%), portanto foi uma lesão encontrada em apenas 1 terço das amostras, sendo menos comum se comparada com outras lesões. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controle e infetado.

- Intensidade

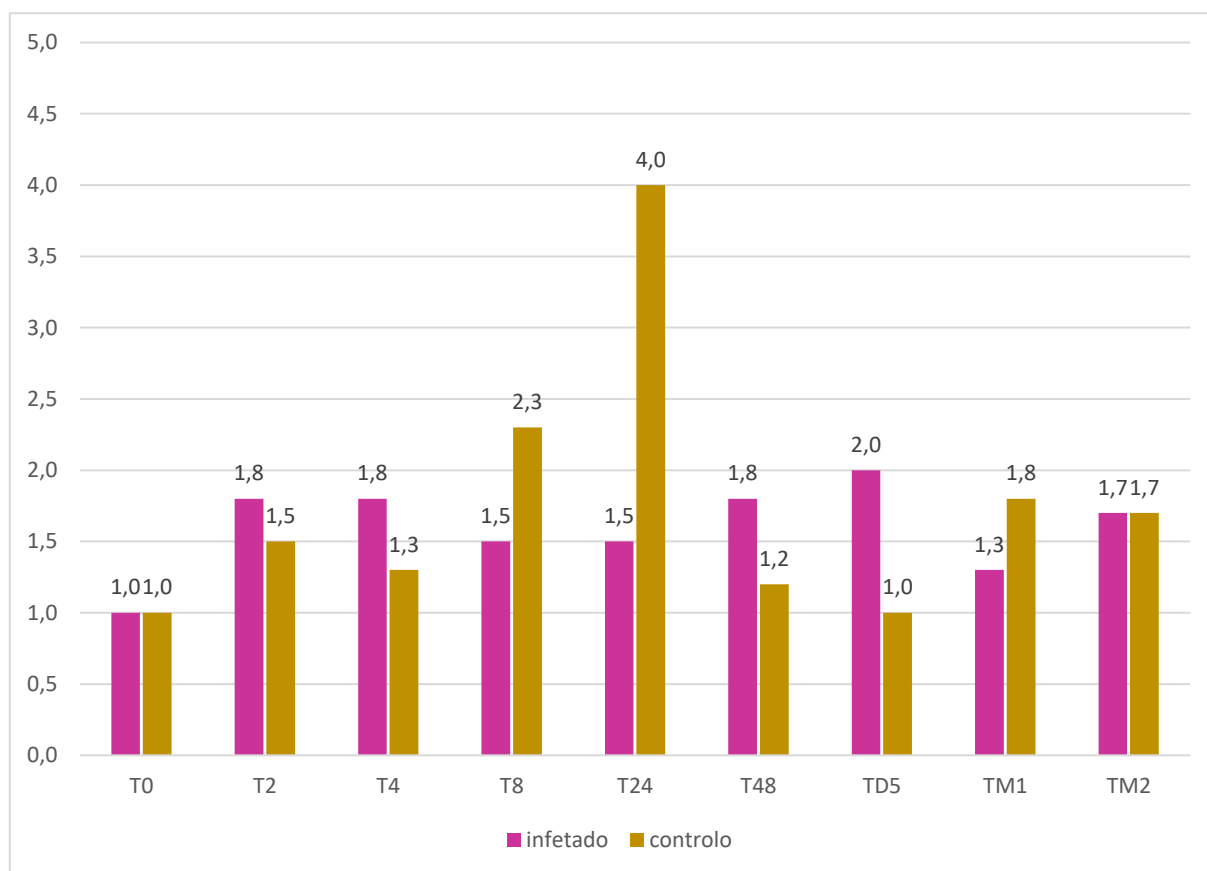


Observações:

O grupo infetado apresentou, apesar do início se apresentar com 1,0 (T0), valores entre 1,8 e 3,3 na fusão lamelar, distribuídos de forma homogénea, e o grupo de controlo apresentou valores entre 2,2 e 3,5, com exceção de T0 com 1,0 valores. Em ambos os grupos são observadas algumas diferenças de decréscimos de valores. No grupo controlo observamos uma recaída de T8 a T48, e no grupo infetado existe um decréscimo de T4 para T8 e que se repete em T48. A média do grupo controlo é de 2,6 valores e infetado 2,5 valores, demonstrando que esta lesão se manifestou entre o visível e o evidente por todo o ensaio. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controlo e infetado.

5 - Regressão tubular

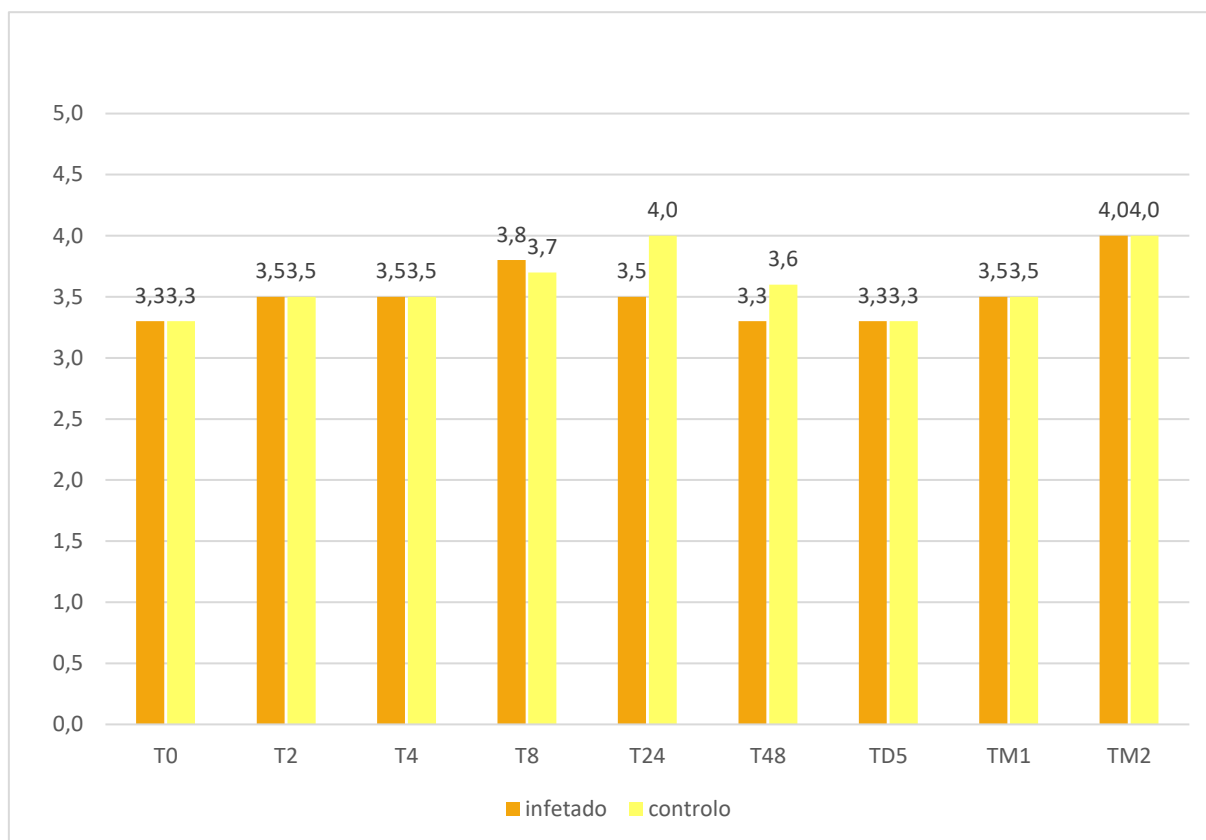
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou, na lesão de regressão tubular, valores entre 1,0 e 2,0, sendo contida por todo o ensaio. O grupo controlo também não se manifestou de forma exacerbada, apresentando valores entre 1,0 e 1,8, havendo 2 valores acima destes, em T8 com 2,3 e um pico de T24 com 4,0 valores. Ambos os grupos não apresentaram uma evolução da sua dispersão, mostrando valores muito regulares e próximos entre si. A média do grupo controlo é de 1,8 (36%) e do grupo infetado de 1,6 (32%), portanto foi uma lesão encontrada em apenas 1 terço das amostras. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controlo e infetado.

- Intensidade

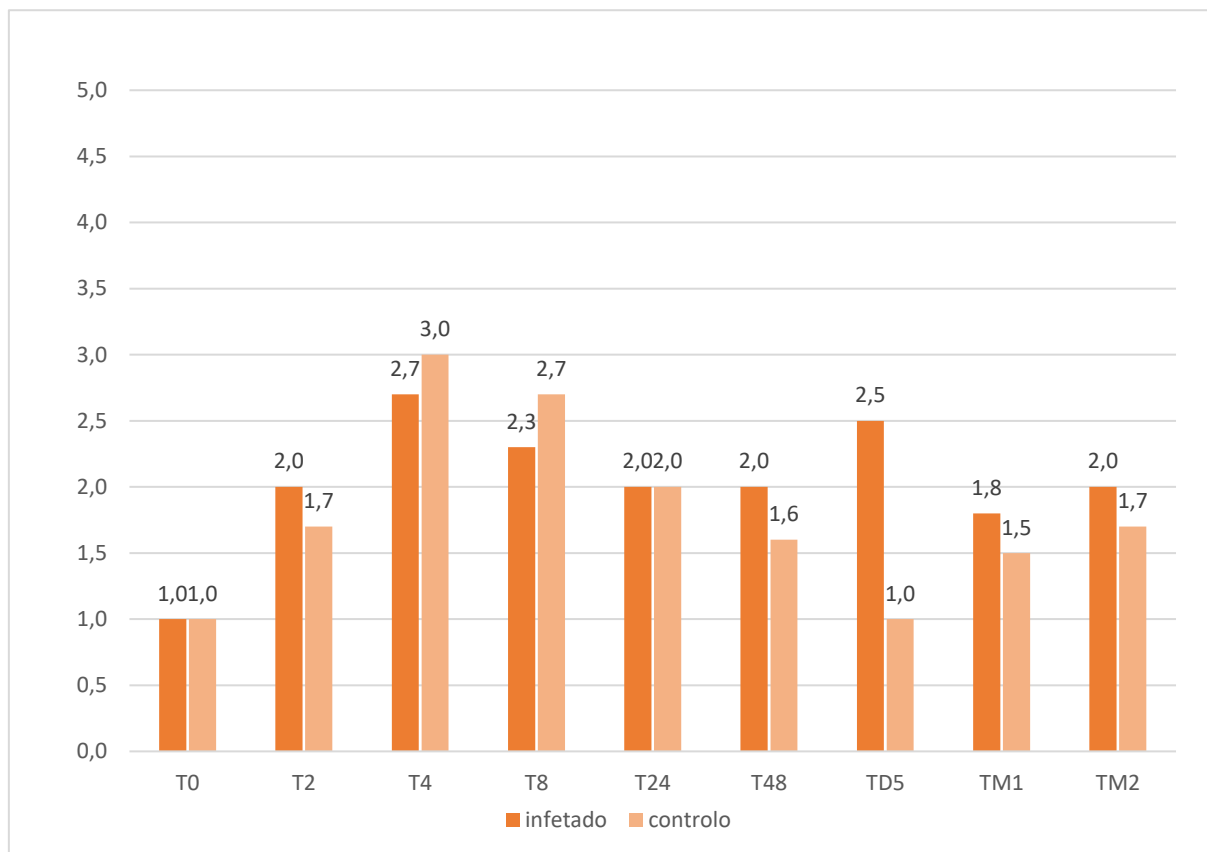


Observações:

O grupo infetado apresentou valores de regressão tubular muito próximos entre si, entre 3,3 e 4,0. Os valores do grupo controle variou entre 3,3 e 4,0 e acompanharam sempre os valores do grupo infetado. Ambos os grupos apresentaram valores muito próximos entre si e sem sinal de evolução da intensidade de lesão e com valores muito constantes. A média do grupo controle foi de 3,6 e do grupo infetado foi de 3,5, demonstrando a regressão tubular de forma “muito evidente” em todo o ensaio. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo de controle e infetado.

6 - Necrose

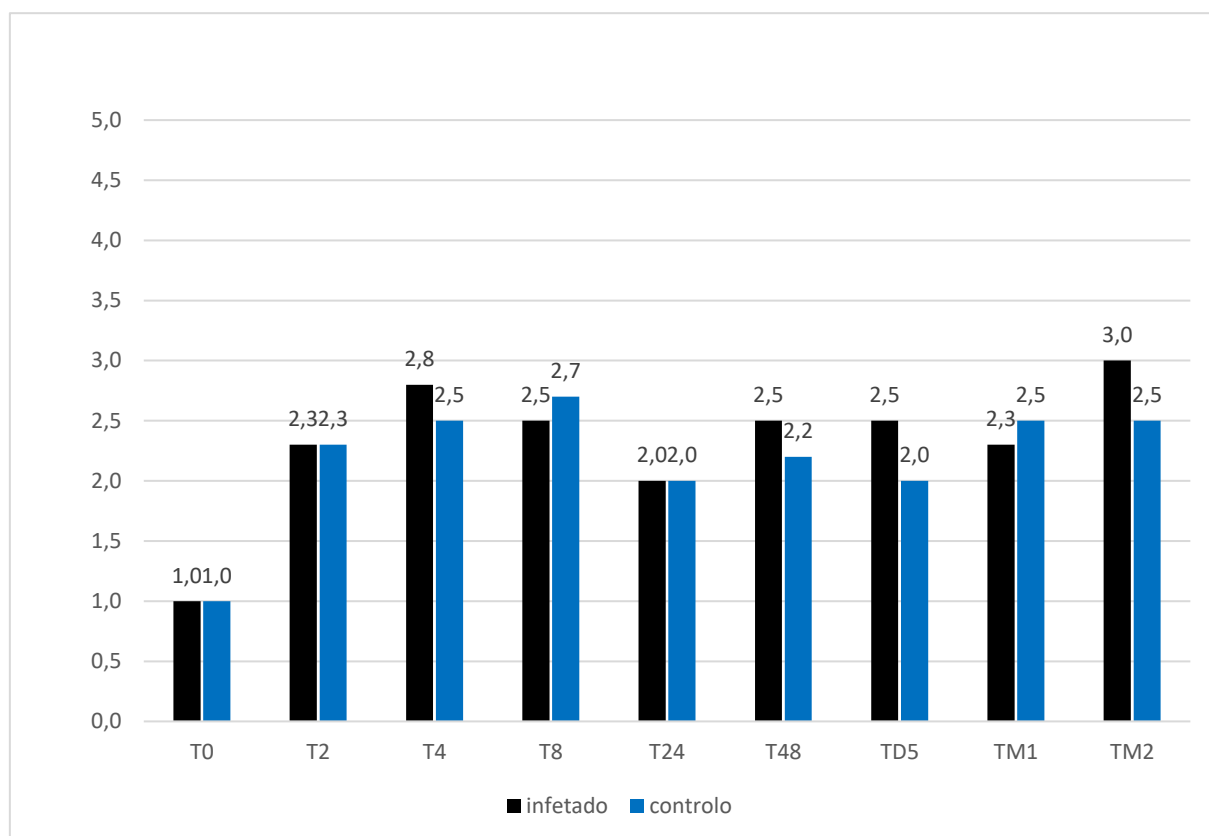
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou, apesar de apresentar 1,0 em T0, valores de necrose entre 2,0 e 2,7 e sem sinais de evolução da lesão. O grupo controle apresentou valores entre 1,0 e 3,0, apresentando uma subida até T4 mas seguida de uma descida por todo o ensaio ate TD5, voltando a subir somente em TM1. Ambos os grupos apresentaram um aumento significativo da dispersão de necrose até aos T4, seguido de uma diminuição em ambos os grupos, existindo apenas um pico em TD5 em infetados, com 2,5 valores, o que comparativamente ao grupo controle (1,0 valores) foi relevante. A média do grupo controle é de 1,8 (36%) e de infetados de 2,0 (40%), portanto foi uma lesão que foi encontrada em pelo menos 1 terço das amostras. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controle e infetado.

- Intensidade

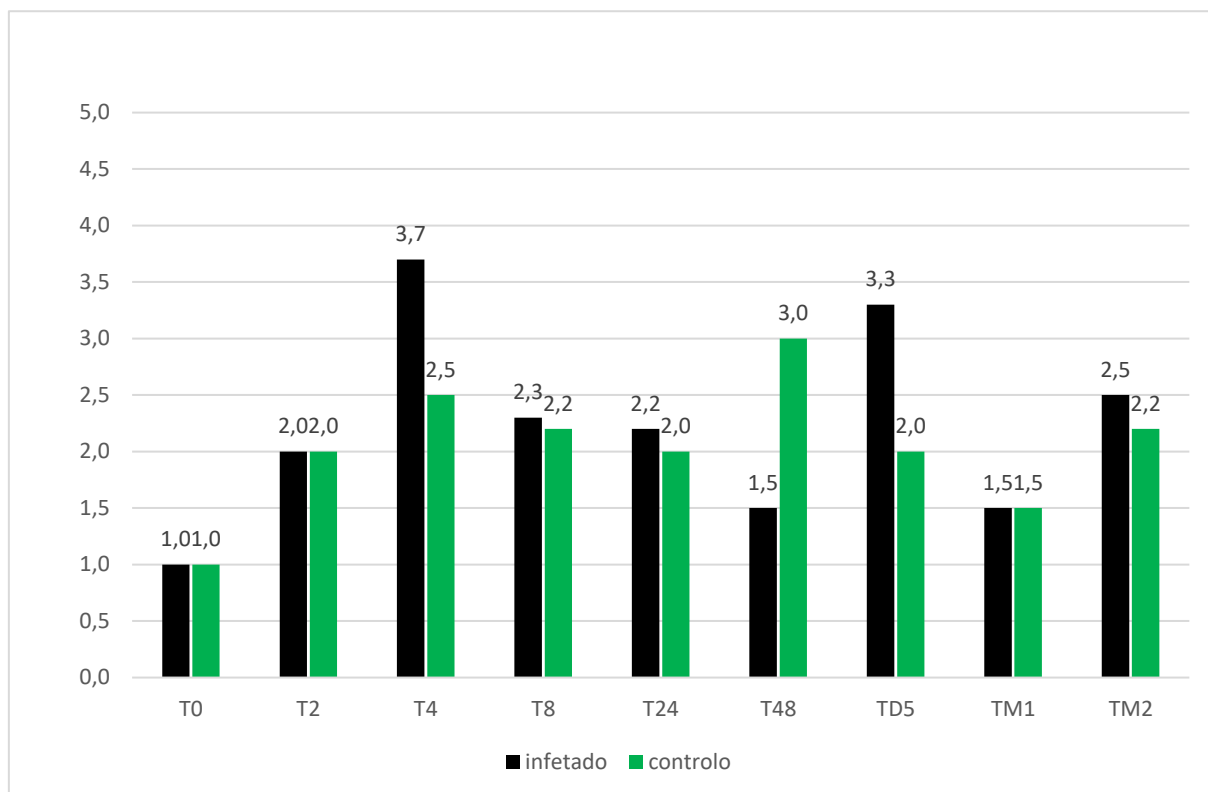


Observações:

O grupo infetado apresentou valores de necrose entre 2,0 e 3,0, não demonstrando haver uma evolução da lesão ao longo do ensaio. O grupo controlo apresentam valores entre 2,0 e 2,7. Apenas T0 fugiu à regra para ambos os grupos, apresentando 1,0 valores. A média do grupo controlo é de 2,2 e do grupo de infetados é de 2,3 valores, podendo afirmar-se que a lesão foi entre o visível e o evidente. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controlo e infetado.

7 - Erosão

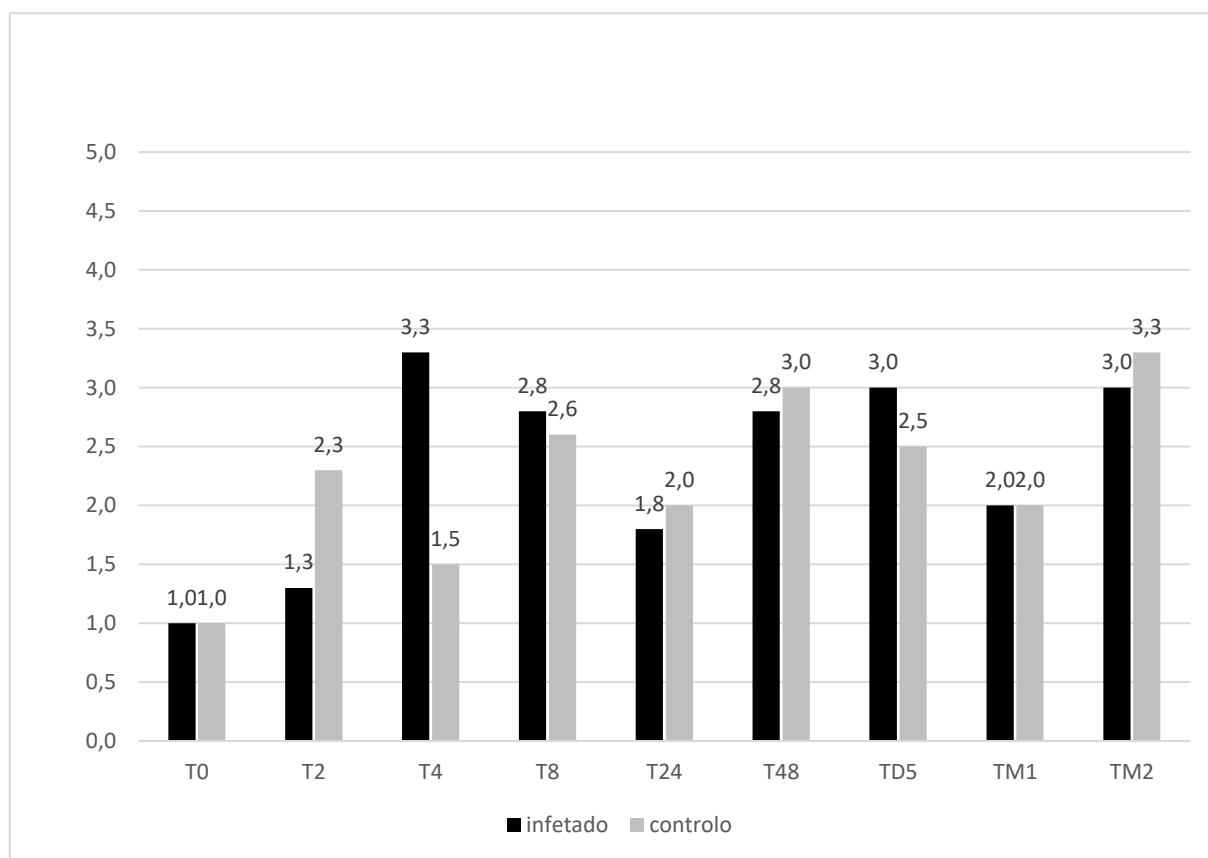
- Dispersão



Observações:

O grupo infetado apresentou na erosão valores entre 1,0 e 2,5, apresentando, no entanto, 2 exceções em T4 e TD5 com 3,7 e 3,3 valores respetivamente. O grupo controle apresentou valores entre 1,5 e 3,0, com a exceção de em T0 apresentar 1,0 valores para ambos os grupos. Em ambos os grupos não foi observado uma evolução na dispersão da lesão, apesar das oscilações identificadas. A média do grupo controle é de 2,0 (40%) e do grupo infetado de 2,2 (44%), portanto foi uma lesão que foi encontrada entre 40-45% das amostras. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controle e o grupo infetado.

- Intensidade



Observações:

O grupo infetado apresentou valores de erosão entre 1,0 e 3,3, não apresentando uma evolução da lesão ao longo do ensaio. A ausência da evolução da lesão também se verificou no grupo controle que apresentou valores entre 1,0 e 3,3. Embora os 2 grupos tenham apresentados valores semelhantes entre si, apresentaram oscilações diferentes, mas sem uma explicação plausível. A média do grupo controle é de 2,2 e do grupo de infetados é de 2,3 valores, podendo afirmar-se que a lesão foi visível, embora não de forma exacerbada. Os resultados sugerem que não houve uma diferença significativa entre o grupo controle e infetado.

Anexo VI – Tabelas da classificação histológica das lesões identificadas nas ostras *Crassostrea gigas*:

Todos os resultados observados foram tabelados (Tabelas IV a XI). Apesar das intensidades e dispersões terem sido quase sempre diferentes, todos os sinais de lesão observados nas brânquias e trato digestivo foram identificados do início ao fim do ensaio, demonstrando que estiveram sempre presentes, tanto no grupo de controlo, como no grupo de infetados.

Tal como explicado em Material e Métodos, todos os resultados foram tabelados de 0 a 5, onde:

- Em Dispersão 0 significa 0% da amostra apresentava a lesão e 5 significa 100% da amostra apresentava a lesão
- Em Intensidade 0 significa que esta foi nulo e 5 significa que foi extremamente evidente

Brânquias – Intensidade

A intensidade das lesões observada nas brânquias da ostra é apresentada na Tabela I. De uma forma geral, verificamos que o grupo Infetado apresentou em T120 valores medianos a Hiperplasia Epitelial (2,5/5), a Hiperplasia das células de muco (2,8/5), a Hiperplasia das células granulares (2,2/5) e a Necrose (2,5/5), fazendo-se notar mais em Infiltração de hemócitos (3,8/5) e Erosão (3,7/5).

Tabela I. Resultados da observação dos cortes histológicos das brânquias de ostra (*Crassostrea gigas*) durante o ensaio experimental, sobre a intensidade das lesões observadas no grupo Controlo (C) e Infetado (I). Relativamente à intensidade de uma lesão, foi considerado: 0 nula; 1 encontrada de forma suave/discreta; 2 encontrada de forma visível; 3 encontrada de forma notória; 4 encontrada de forma muito evidente; 5 extremamente evidente.

Tempo	Hiperplasia Epitelial		Hiperplasia das células de muco		Hiperplasia das células granulares		Infiltração de hemócitos		Necrose		Erosão	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
T0	2,2		2,8		3,5		2,8		0,7		2,7	
T2	1,7	1,8	2,2	2,3	2,3	2,3	2,0	2,3	2,0	1,0	2,7	2,8
T4	1,3	2,5	2,0	2,3	3,8	2,5	2,0	3,5	0,5	1,7	1,5	3,2
T8	2,0	1,5	1,2	1,5	2,8	2,3	2,0	2,3	1,5	1,0	2,2	3,7
T24	1,8	1,5	2,0	1,7	2,0	1,5	2,8	2,5	2,3	1,5	2,8	4,0
T48	2,0	1,8	2,0	1,5	2,8	3,0	2,8	2,2	1,3	1,7	2,8	3,5
T120	2,0	2,5	2,3	2,8	3,0	2,2	3,3	3,8	1,5	2,5	3,7	3,7

Relativamente à forma como a intensidade das lesões variou com a colocação das ostras num tanque de produção, ou seja, sem estar na presença do *A. ocellatum* está apresentado na Tabela II. Em T120 podemos observar que a evolução das lesões foi de uma maneira geral pouco pronunciada, tendo manifestado relevância apenas relativamente à Necrose (1/5) e Erosão (2,8/5). Podemos observar também que existe uma ligeira recuperação nível da hiperplasia epitelial e uma recuperação mais notória em Hiperplasia das células de muco, Infiltração de hemócitos.

Tabela II. Resultados da observação dos cortes histológicos das brânquias de ostra (*Crassostrea gigas*) durante o período de recuperação (2 meses-TM2), após final do ensaio de infeção. Esta avaliação teve como ponto de partida o T120. I – Infetados e C – Controlo. Relativamente à intensidade de uma lesão, foi considerado: 0 nula; 1 encontrada de forma suave/discreta; 2 encontrada de forma visível; 3 encontrada de forma notória; 4 encontrada de forma muito evidente; 5 extremamente evidente.

	Hiperplasia Epitelial		Hiperplasia das células de muco		Hiperplasia das células granulares		Infiltração de hemócitos		Necrose		Erosão	
Tempo	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
T0(T120)	2,0	2,5	2,3	2,8	3,0	2,2	3,3	3,8	1,5	2,5	3,7	3,7
TM1	2,5	2,5	3,0	2,7	3,0	3,3	3,0	3,3	2,7	2,3	3,5	3,3
TM2	2,7	2,3	3,5	2,0	1,7	2,8	3,0	3,0	3,0	1,0	3,5	2,8

Brânquias – Dispersão

A dispersão das lesões observada nas brânquias da ostra é apresentada na Tabela III. De uma forma geral verificamos que o grupo Infetado apresentou em T120 valores acima de 60% (de 3/5 para cima) com a exceção da Necrose (2,2/5). O valor que se destacou foi a Infiltração de hemócitos (4,5/5).

Tabela III. Resultados da observação dos cortes histológicos das brânquias de ostra (*Crassostrea gigas*) durante o ensaio experimental, sobre a dispersão das lesões observadas no grupo Controlo (C) e Infetado (I). Relativamente à dispersão de uma lesão, foi considerado: 0 representa que a mesma foi nula; 1 encontrada em cerca 20% da amostra; 2 encontrada em cerca de 40% da amostra; 3 encontrada em cerca de 60% da amostra; 4 encontrada em cerca de 80% da amostra; 5 encontrada em cerca de 100% da amostra

	Hiperplasia Epitelial		Hiperplasia das células de muco		Hiperplasia das células granulares		Infiltração de hemócitos		Necrose		Erosão	
Tempo	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
T0	3,5		3,7		5,0		5,0		1,0		2,3	
T2	2,0	3,0	2,2	2,5	3,8	2,8	4,4	3,5	2,3	1,3	2,8	2,7
T4	1,5	2,8	2,5	1,7	3,5	3,7	4,0	3,8	0,5	1,5	2,0	3,7
T8	2,7	1,3	2,7	2,7	3,7	3,2	3,3	4,2	1,3	1,3	2,3	3,5
T24	2,8	3,0	2,5	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	2,0	2,5	3,8	3,5
T48	3,3	2,3	2,5	3,0	3,3	3,3	3,7	3,2	1,3	2,2	3,0	2,7
T120	2,7	3,3	2,7	3,0	3,7	3,3	4,3	4,5	1,7	2,2	3,3	3,8

Relativamente à forma como a dispersão das lesões variou com a colocação das ostras num tanque de produção, ou seja, sem estar na presença do *A. ocellatum* está apresentado na Tabela IV. Em TM2 podemos observar que a evolução destas mesmas lesões foi de uma maneira geral uma ligeira melhoria, apesar de se fazerem notar aumentos em algumas das lesões, sendo as mais notórias a Hiperplasia das células de muco (3,7/5) e a Hiperplasia das células granulares (4/5).

Tabela IV. Resultados da observação dos cortes histológicos das brânquias de ostra (*Crassostrea gigas* durante a recuperação (2 meses – TM2), após ensaio de infeção. Esta avaliação teve como ponto de partida o T120. I – Infetado e C – Controlo. Relativamente à dispersão de uma lesão, onde: 0 representa que a mesma foi nula; 1 encontrada em cerca 20% da amostra; 2 encontrada em cerca de 40% da amostra; 3 encontrada em cerca de 60% da amostra; 4 encontrada em cerca de 80% da amostra; 5 encontrada em cerca de 100% da amostra.

	Hiperplasia Epitelial		Hiperplasia das células de muco		Hiperplasia das células granulares		Infiltração de hemócitos		Necrose		Erosão	
Tempo	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
T120=T0 Recuperação	2,7	3,5	2,7	3,0	3,7	3,3	4,3	4,5	1,7	2,2	3,3	3,8
TM1	3,8	3,2	4,0	4,0	4,5	4,2	4,0	4,2	2,0	2,3	4,0	3,7
TM2	2,8	3,0	3,3	3,7	2,7	4,0	4,0	4,0	2,0	1,7	3,8	3,3

Trato digestivo – Intensidade

A intensidade das lesões observada no trato digestivo da ostra estão apresentadas na Tabela V. De uma forma geral verificamos que o grupo Infetados apresentou em T120 valores na metade superior (acima de 2,5) mas não superiores a 3,3, com exceção de Enterite (4,3/5).

Tabela V. Resultados da observação dos cortes histológicos do trato digestivo da ostra (*Crassostrea gigas*) durante o ensaio experimental, sobre a intensidade das lesões observadas no grupo Controlo (C) e Infetado (I). Relativamente à intensidade de uma lesão, foi considerado: 0 representa que a mesma foi nula; 1 encontrada de forma suave/discreta; 2 encontrada de forma visível; 3 encontrada de forma notória; 4 encontrada de forma muito evidente; 5 extremamente evidente

Tempo	Hemócitos infiltração		Hemócitos agregados		Enterite		Fusão lamelar		Regressão tubular		Necrose		Erosão	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
T0	3,0		2,8		3,0		1,0		3,3		1,0		1,0	
T2	3,3	2,8	3,5	3,0	2,5	2,3	2,5	1,8	3,5	3,5	2,3	2,3	2,3	1,3
T4	3,0	2,8	3,5	3,3	2,5	3,2	3,5	2,3	3,5	3,5	2,5	2,8	1,5	3,3
T8	3,3	3,0	3,0	2,8	3,3	3,3	2,3	1,8	3,7	3,8	2,7	2,5	2,6	2,8
T24	3,0	2,3	2,5	2,0	3,0	2,3	2,5	3,3	4,0	3,5	2,0	2,0	2,0	1,8
T48	2,3	3,3	1,8	3,3	2,2	3,5	2,2	2,0	3,6	3,3	2,2	2,5	3,0	2,8
T120	2,5	3,3	3,3	3,3	3,5	4,3	3,5	3,3	3,3	3,3	2,0	2,5	2,5	3,0

Relativamente à forma como a intensidade das lesões variou com a colocação das ostras num tanque de produção, ou seja, sem estar na presença do *A. ocellatum* está apresentado na Tabela VI. Em TM2 podemos observar que a evolução destas mesmas lesões foram todas elas compreendidas entre 3/5 e 4/5. Apresentando, portanto, uma evolução com poucas alterações significativas.

Tabela VI. Resultados da observação dos cortes histológicos do trato digestivo de ostra (*Crassostrea gigas* durante a recuperação (2 meses – TM2), após o ensaio de infeção. Esta avaliação teve como pontos de partida o T120. I – Infetado e C – Controlo. Relativamente à intensidade de uma lesão, onde: 0 representa que a mesma foi nula; 1 encontrada de forma suave/discreta; 2 encontrada de forma visível; 3 encontrada de forma notória; 4 encontrada de forma muito evidente; 5 extremamente evidente

Tempo	Hemócitos infiltração		Hemócitos agregados		Enterite		Fusão lamelar		Regressão tubular		Necrose		Erosão	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
T120	2,5	3,3	3,3	3,3	3,5	4,3	3,5	3,3	3,3	3,3	2,0	2,5	2,5	3,0
TM1	2,5	3,3	2,8	3,3	3,0	3,0	3,3	2,8	3,5	3,5	2,5	2,3	2,0	2,0
TM2	4,0	3,7	4,3	3,7	3,7	4,0	2,5	2,8	4,0	4,0	2,5	3,0	3,3	3,0

Trato digestivo – Dispersão

A Dispersão das lesões observada no trato digestivo da ostra estão apresentadas na Tabela VII. De uma forma geral verificamos que o grupo Infetados apresentou em T120 valores distintos nas diversas lesões. Apresentou valores entre 1,8/5 e 3,3/5, com a exceção da Enterite que apresentou 4,3/5.

Tabela VII. Resultados da observação dos cortes histológicos das Trato Digestivo de ostra (*Crassostrea gigas*) durante o ensaio experimental, sobre a dispersão das lesões observadas no grupo Controlo (C) e Infetado (I). Relativamente à dispersão de uma lesão, foi considerado: 0 representa que a mesma foi nula; 1 encontrada em cerca 20% da amostra; 2 encontrada em cerca de 40% da amostra; 3 encontrada em cerca de 60% da amostra; 4 encontrada em cerca de 80% da amostra; 5 encontrada em cerca de 100% da amostra.

	Hemócitos infiltração		Hemócitos agregados		Enterite		Fusão lamelar		Regressão tubular		Necrose		Erosão	
Tempo	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
T0	1,5		1,5		3,0		2,0		1,0		1,0		1,0	
T2	1,0	2,0	1,3	1,8	2,5	3,0	1,0	1,5	1,5	1,8	1,7	2,0	2,0	2,0
T4	1,0	1,5	1,3	1,5	2,3	2,5	1,3	1,8	1,3	1,8	3,0	2,7	3,7	2,5
T8	3,8	3,5	3,5	2,8	3,5	3,8	2,2	1,3	2,3	1,5	2,7	2,3	2,2	2,3
T24	3,0	2,2	2,5	1,5	3,0	2,5	2,5	1,5	4,0	1,5	2,0	2,0	2,0	2,2
T48	2,3	3,3	1,3	3,0	1,7	3,0	1,2	1,5	1,2	1,8	1,6	2,0	3,0	1,5
T120	3,0	2,8	1,5	2,8	3,8	4,3	1,3	1,8	1,0	2,0	1,0	2,5	2,0	3,3

Relativamente à forma como a dispersão das lesões variou com a colocação das ostras num tanque de produção, ou seja, sem estar na presença do *A. ocellatum* está apresentado na Tabela VIII. Em TM2 podemos observar que a evolução destas mesmas lesões apresentou melhorias quando nos referimos a Fusão lamelar (1,3/5), Regressão tubular (1,7), Necrose (2,0/5) e Erosão (2,5/5), assim como um agravamento das lesões quando nos referimos a infiltração de hemócitos (3,7/5), a agregados de hemócitos (3,7/5) e Enterite (5/5).

Tabela VII. Resultados da observação dos cortes histológicos do trato digestivo de ostra (*Crassostrea gigas* durante a recuperação (2 meses – TM2) após ensaio de infeção. Esta avaliação teve como ponto de partida o T120. I – Infetado e C – Controlo. Relativamente à intensidade de uma lesão, onde: 0 representa que a mesma foi nula; 1 encontrada em cerca 20% da amostra; 2 encontrada em cerca de 40% da amostra; 3 encontrada em cerca de 60% da amostra; 4 encontrada em cerca de 80% da amostra; 5 encontrada em cerca de 100% da amostra.

Tempo	Hemócitos infiltração		Hemócitos agregados		Enterite		Fusão lamelar		Regressão tubular		Necrose		Erosão	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
T120	3,0	2,8	1,5	2,8	3,8	4,3	1,3	1,8	1,0	2,0	1,0	2,5	2,0	3,3
TM1	3,3	4,0	3,3	3,5	2,8	3,5	2,0	1,3	1,8	1,3	1,5	1,8	1,5	1,5
TM2	4,2	3,7	4,3	3,7	4,0	5,0	1,0	1,3	1,7	1,7	1,7	2,0	2,2	2,5