



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

**MICROBIOMA BACTERIANO ASSOCIADO AO SISTEMA
DIGESTIVO E CIRCULATÓRIO do CHOCO (*Sepia officinalis*, L.)**

Leonildo dos Anjo Viagem

**Dissertação para a obtenção do grau de mestre
em Biologia Molecular e Microbiana**

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professora Doutora Filomena Fonseca

Doutor Juan Fuentes

2018

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

**MICROBIOMA BACTERIANO ASSOCIADO AO SISTEMA
DIGESTIVO E CIRCULATÓRIO do CHOCO (*Sepia officinalis*, L.)**

Leonildo dos Anjo Viagem

Dissertação para a obtenção do grau de mestre
em Biologia Molecular e Microbiana

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professora Doutora Filomena Fonseca

Doutor Juan Fuentes

2018

Microbioma bacteriano associado ao sistema digestivo e circulatório do choco (*Sepia officinalis*, L.)

Declaração de autoria do trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Leonildo dos Anjo Viagem

Direitos de cópia ou Copyright

© Copyright: Leonildo dos Anjo Viagem

Após publicação do seu conteúdo em revistas da especialidade e de acordo com o ponto 4.2 do Anexo II a que se refere o ponto 2 do artigo 18º do Regulamento nº 287/2021 publicado em Diário da República, a 24 de Julho de 2012: A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

APOIO FINANCEIRO

A execução desta Tese recebeu apoio financeiro através de várias fontes:

BOLSA DE ESTUDO: Ministerio da Ciência e Tecnologia, Ensino Superior Técnico Profissional de Moçambique. Number: 17.06.2016

Projeto SEPIACUL: Programa Operacional Mar2020/Portugal2020/FEAMP Project number 16-02-01-FMP-53

Projeto CARIOCA: Fundação para a Ciência e a Tecnologia Project number PTDC/MAR-BIO/3034/2014

CIMA: O CIMA (UAlg) recebe financiamento institucional da Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Project number UID/MAR/00350/2013Cima



CCMAR: O CCMAR recebe financiamento institucional da Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Project number: UID/Multi/04326/2013



AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de expressar a minha mais profunda gratidão aos meus orientadores, Professora Filomena Fonseca (FCT-UAAlg) e Doutor Juan Fuentes (CCMAR-UAAlg), pela oportunidade que me concederam de realizar esta pesquisa, pelos conselhos e orientações durante todo o processo de pesquisa e que de forma sabia ensinaram-me o quão é necessário ser organizado, ter paciência e ser persistente durante a pesquisa do laboratório.

Aos investigadores da Estação Marinha do Ramalhete, especialmente ao Doutor António Sykes (CCMAR), por ter fornecido os animais usados neste trabalho.

Agradeço ao meu tutor de estágio na Universidade Pedagógica de Moçambique, Juvêncio Manuel Nota, pela amizade, compreensão e ensinamentos. Lembro e sempre me lembrarei dos primeiros passos que me deu nas suas aulas de Biologia Celular e Molecular, e Microbiologia, foi daí que surgiu a minha paixão pela Biologia Molecular. Para sempre serás a minha fonte de inspiração.

A nível institucional, agradeço a Universidade Pedagógica de Moçambique por ter aceitado e me dispensado para esta “aventura” académica.

Agradeço a minha mãe Mónica Daniel Lima pelo fato de dar-me a oportunidade de viver e mostrar-me o bom caminho da vida, e pelos momentos que choraste de saudades. Lembre-se que estarás sempre comigo em todos os momentos da minha vida.

Um agradecimento especial vai para minha namorada, Florida Nelson Bernardo que mesmo distante soube estar e ser durante os momentos difíceis que enfrentei. Sempre dizendo “vai dar tudo certo”, “acredite no seu potencial”, foste uma verdadeira terapeuta de psicologia.

Aos meu colegas do mestrado em biologia molecular e microbiana, especialmente a Inês Maia pelo apoio moral durante a minha integração. Nunca pensei que um dia do outro lado do mundo encontraria pessoas tão especiais.

RESUMO

A *Sepia officinalis*, conhecida por choco (Portugal, Espanha) faz parte do grupo dos cefalópodes, considerados como espécies promissoras para a diversificação na indústria da aquacultura, e são considerados modelos biológicos para investigação, principalmente, na Neurociência e Fisiologia Animal. No entanto, a produção em grande escala tem sido afetada pela inexistência de alternativas nutricionais para a alimentação. Pesquisas que são desenvolvidas para a descoberta de fontes alternativas de nutrição, estão centradas na análise de componentes químicos dos alimentos no crescimento do choco.

A microbiota desempenha um papel importante, particularmente no funcionamento do trato digestivo e do sistema imunitário. Através da produção e metabolização de substâncias a microbiota pode influenciar a fisiologia e desenvolvimento do animal. Assim neste trabalho, o objetivo fundamental foi o de obter informações da potencial associação das comunidades bacterianas em diferentes regiões do sistema digestivo do choco: hepatopâncreas, estômago, ceco, intestino, esófago e divertículo assim como no sistema circulatório, nomeadamente na hemolinfa. Um segundo objetivo foi o de verificar o potencial efeito da alimentação/ jejum nas comunidades microbianas, os animais foram amostrados antes e depois da alimentação e extraídos os órgãos do trato digestivo e hemolinfa.

Com base na utilização do 16SRNA ribossomal, o DNA das amostras da hemolinfa e das regiões discretas do trato digestivo foram extraídos e amplificados por PCR e as sequências analisadas com ferramentas bioinformáticas. Os resultados indicaram que os animais amostrados antes da alimentação apresentaram maior diversidade em comparação com os animais amostrados após a alimentação, com a família *Mycoplasmataceae* a representarem o microbioma fundamental, e as famílias *Oxalobacteriaceae* e *Burkholderaceae* o microbioma raro. A hemolinfa foi o local de maior diversidade e o esófago apresentou a maior diversidade no trato digestivo.

No seu conjunto, o estudo mostrou diferenças individuais em termos de composição e diversidade taxonómica do microbioma. A utilização desta diversidade na microbiota poderá vir a ser importante como índice de bem-estar animal e para o desenvolvimento de dietas comerciais para a aquacultura da espécie.

Palavras-chave: Microbioma, diversidade, trato digestivo, hemolinfa, choco, microbioma fundamental, microbioma total, microbioma raro.

ABSTRACT

Sepia officinalis, known as cuttlefish (“choco”, Portugal, Spain) is a group of cephalopods, currently considered promising for the diversification of species in aquaculture. Also, cephalopods are considered good biological models for scientific research, mainly in Neurosciences and Animal Physiology. However, large-scale production has been affected by the lack of a nutritional alternatives to its live diet. Hence, current research on this species in the context of aquaculture is focused on the development of artificial feeds for cuttlefish growth.

The microbiota plays a key role in the operation of the digestive tract and the immune system. This role is achieved through the production and metabolization of substances that may influence the physiology and development of the animal. Thus, the current work was undertaken to gather information about the potential association of bacterial communities in the cuttlefish. A first objective focused on different regions of the gastrointestinal tract: hepatopancreas, stomach, cecum, intestine, esophagus and diverticulum; and in the circulatory system, namely in the hemolymph. A second objective of the work focused on the putative effect of feeding/fasting in the configuration of microbiota. To achieve these goals cuttlefish individual tissues and hemolymph were sampled before and after feeding.

Based on molecular methods, 16S ribosomal RNA, DNA from the hemolymph and digestive tract samples were extracted, amplified by PCR and sequences analyzed by using bioinformatic tools. Analysis of the results indicated that animals sampled before feeding had greater diversity in the microbiomes when compared to animals sampled after feeding. The *Mycoplasmataceae* was “the” family in the core biome. In turn, the families *Oxalobacteriaceae* and *Burkholderiaceae* represented the rare biome. Hemolymph showed the greatest microbiome diversity of all samples. While the esophagus was the tissue with the highest diversity in the digestive tract.

Analysis of individual animals revealed differences in composition and taxonomic diversity. This study opens perspectives for conducting research aimed at the discovery of probiotics in cuttlefish aquaculture.

Keywords: Microbiome, diversity, digestive tract, hemolymph, cuttlefish, *core biome*, total biome, rare biome.

ÍNDICE GERAL

| | Pág. |
|--|------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | X |
| ÍNDICE DE TABELAS | XIX |
| ABREVIATURAS | XX |
| CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA | 1 |
| 1.1. Contextualização | 1 |
| 1.2. Caracterização da <i>S. officinalis</i> : ecologia, anatomia e fisiologia | 2 |
| 1.3. Colonização da microbiota ao sistema digestivo e circulatório dos animais aquáticos | 6 |
| 1.4. Fatores que influenciam a colonização da microbiota nos animais aquáticos | 8 |
| 1.5. O papel da microbiota do trato digestivo e hemolinfa nos animais aquáticos | 9 |
| 1.6. Efeito da dieta sobre a microbiota dos animais aquáticos | 11 |
| 1.7. 16S rRNA: Ferramenta molecular para a caracterização do microbioma | 12 |
| 1.8. A escassa informação do microbioma dos cefalópodes | 12 |
| OBJETIVOS | 14 |
| CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 2.1. Proveniência dos animais e colheita das amostras | 15 |
| 2.2. Extração e amplificação do DNA bacteriano por PCR | 15 |
| 2.3. Clonagem e Transformação | 17 |
| 2.4. Análise das colónias recombinantes | 18 |
| 2.5. Análise bioinformática | 19 |
| 2.5.1. Tratamento e edição das sequências | 19 |
| 2.5.2. O programa computacional MEGAN | 19 |
| 2.5.3. Identificação taxonómica nas amostras e índices de diversidade | 22 |
| 2.5.4. Determinação do microbioma em cada compartimento amostrado | 23 |
| 2.5.5. Comparação entre AA e DA | 23 |
| CAPÍTULO III: RESULTADOS | 25 |
| 3.1. Caracterização dos animais amostrados | 25 |
| 3.2. Sequências obtidas e preparação dos ficheiros para MEGAN | 25 |
| 3.3. Apresentação dos resultados com base nas análises bioinformáticas feitas em MEGAN | 26 |
| 3.4. Diversidade e composição taxonómica do microbioma da hemolinfa e de compartimentos do trato digestivo em cada indivíduo | 27 |
| 3.4.1. Indivíduos AA | 27 |
| 3.4.2. Indivíduos DA | 31 |
| 3.5. Microbioma total, microbioma fundamental e microbioma raro da hemolinfa e de compartimentos do trato digestivo | 34 |
| 3.5.1. Caracterização do microbioma associado à hemolinfa em animais AA | 34 |
| 3.5.2. Caracterização do microbioma associada ao esófago em AA | 38 |
| 3.5.3. Caracterização do microbioma associada ao hepatopâncreas em animais AA | 42 |
| 3.5.4. Caracterização do microbioma associada ao divertículo em animais AA | 46 |
| 3.5.5. Caracterização do microbioma associada ao estômago em animais AA | 50 |
| 3.5.6. Caracterização do microbioma associada ao ceco em animais AA | 54 |
| 3.5.7. Caracterização do microbioma associada ao intestino em animais AA | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.8. Caracterização do microbioma associada à hemolinfa em animais DA | 60 |
| 3.5.9. Caracterização do microbioma associada ao intestino em animais DA | 64 |
| 3.6. Índices de diversidade dos microbiomas | 68 |
| 3.7. Efeito da alimentação no microbioma da hemolinfa e do intestino | 69 |
| CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO E CONCLUSÃO | 75 |
| 4.1. Discussão | 75 |
| 4.2. Conclusão | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Figura 1.1. Sistema digestivo do choco (<i>S. officinalis</i>). A. Anatomia do sistema digestivo, B. relação entre estomago, ceco e saco de tinta (Adaptado de Parker & Haswell, 1972) | 4 |
| Figura 1.2. Anatomia do sistema circulatório do choco (<i>S. officinalis</i>) (adaptado de Parker e Haswell, 1972) | 5 |
| Figura 2.1. Dissecção do choco. A e B: dissecção mostrando os órgãos internos do choco e C: local onde foi extraída a hemolinfa | 16 |
| Figura 2.2. Mapa dos primers universais, disponíveis na literatura, para o gene 16S rRNA e as respectivas regiões hipervariáveis. Dentro do quadrado vermelho estão representadas as regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA amplificadas neste trabalho com o par 27F e 534R (esquema adaptado de Yang et al., 2016). | 17 |
| Figura 3.1: Comparação do perfil taxonômico (composição e frequência de táxones) do microbioma no individuo 1 (A), individuo 2 (C) e individuo 3 (E) e curva de rarefação do individuo 1 (B), individuo 2 (D), individuo 3 (F). amostrados antes da alimentação (AA). Os perfis taxonômicos mostram os táxones encontrados, ao nível da família, e a percentagem de sequências resumidas em cada táxon presente em cada amostra. As curvas de rarefação mostram a variação do número de táxones em função do número de sequências | 28 |
| Figura 3.2. Comparação do perfil taxonômico (A, composição e frequência de táxones) do microbioma da hemolinfa no individuo 4 (HL4), individuo 5 (HL5) e individuo 6 (HL6) e respectivas curvas de rarefação (B). Os perfis taxonômicos mostram os táxones encontrados, ao nível da família, e a percentagem de sequências resumidas em cada táxon presente em cada amostra. As curvas de rarefação mostram a variação do número de táxones em função do número de sequências | 31 |
| Figura 3.3. Comparação do perfil taxonômico (A, composição e frequência de táxones) do microbioma do intestino no individuo 4 (I4), individuo 5 (I5) e individuo 6 (I6) e respectivas curvas de rarefação (B). Os perfis taxonômicos mostram os táxones encontrados, ao nível da família, e a percentagem de sequências resumidas em cada táxon presente em cada amostra. As curvas de rarefação mostram a variação do número de táxones em função do número de sequências | 32 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.4: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 35 |
| Figura 3.5: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas das amostras da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 5%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 36 |
| Figura 3.6: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 37 |
| Figura 3.7: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do tubo central (TC) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 39 |

| | |
|---|----|
| <p>Figura 3.8: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do tubo central (TC) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 10%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST</p> | 40 |
| <p>Figura 3.9: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do tubo central (TC) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST</p> | 41 |
| <p>Figura 3.10: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do hepatopâncreas (HP) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST</p> | 43 |
| <p>Figura 3.11: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do hepatopâncreas (HP) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST</p> | 44 |

| | |
|--|----|
| <p>Figura 3.12: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do hepatopâncreas (HP) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST</p> | 45 |
| <p>Figura 3.13: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do divertículo (DIVERT) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST</p> | 47 |
| <p>Figura 3.14: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do divertículo (DIVERT) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.....</p> | 48 |
| <p>Figura 3.15: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do divertículo (DIVERT) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST</p> | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.16: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do estômago (E) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 51 |
| Figura 3.17: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do estômago (E) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 52 |
| Figura 3.18: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do estômago (E) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 53 |
| Figura 3.19: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do ceco (C) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.20: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do ceco (C) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 55 |
| Figura 3.21: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 57 |
| Figura 3.22: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 58 |
| Figura 3.23: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do intestino (I) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.24: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas de hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 61 |
| Figura 3.25: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 5%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 62 |
| Figura 3.26: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 63 |
| Figura 3.27: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.28: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 66 |
| Figura 3.29: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (<i>Lowest Common Ancestor</i>) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST | 67 |
| Figura 3.30: Comparação do perfil taxonômico do microbioma das amostras de hemolinfa dos indivíduos amostrados antes e depois da alimentação (AA vs. DA). O perfil taxonômico mostra os táxones ao nível da família e a percentagem de leituras em cada família | 70 |
| Figura 3.31: Comparação do perfil taxonômico do microbioma nas amostras do intestino dos indivíduos amostrados antes e depois da alimentação (AA vs. DA). O perfil taxonômico mostra os táxones ao nível da família e a percentagem de leituras em cada família | 71 |
| Figura 3.32: Representação gráfica do número de leituras (média de 3 indivíduos \pm desvio padrão) obtidas para os táxones das amostras da hemolinfa (A) e das amostras do intestino (B) de indivíduos amostrados antes (AA) e depois da alimentação (DA) | 72 |
| Figura 3.33: Análise de coordenadas principais (PCoA), mostrando as comunidades microbianas existentes na hemolinfa de animais amostrados antes da alimentação (HL1, HL2 e HL3) e alimentados (HL4, HL5 e HL6). As componentes PC1 (46,8%) e PC2 (26,8%) mostram a variação total nas comunidades bacterianas. A distância de todos os círculos representa as diferenças de dissimilaridade de Bray-Curtis entre as amostras | 73 |

Figura 3.34: Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas do intestino de animais não alimentados (I1, I2 e I3) e alimentados (I4, I5 e I6). As componentes PC1 (85,8%) e PC2 (14,2%) mostram a variação total nas comunidades bacterianas. A distância de todos os círculos representa as diferenças de dissimilaridade de Bray-Curtis entre as amostras

74

ÍNDICE DE TABELAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Tabela 2.1: <i>Primers</i> usados para amplificação das amostras de DNA bacteriano e das colônias recombinantes. | 17 |
| Tabela 3.1: Caracterização dos indivíduos usados neste estudo. | 25 |
| Tabela 3.2: Número de sequências (por indivíduo e total dos três indivíduos) obtidas para cada compartimento, para animais amostrados antes da alimentação (AA) e depois da alimentação (DA). | 26 |
| Tabela 3.3: Comparação da diversidade entre os microbiomas dos indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). | 30 |
| Tabela 3.4: Comparação da diversidade entre as amostras dos indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). | 33 |
| Tabela 3.5: Diversidade do microbioma total na hemolinfa (HL) e no trato digestivo (TC : esôfago; HP : hepatopâncreas; DIV : divertículo; E : estômago; C : ceco e I : intestino) em indivíduos amostrados antes da alimentação (AA) e em indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). | 68 |
| Tabela 3.6: Diversidade do microbioma raro na hemolinfa (HL) e no trato digestivo (TC : tubo central; HP : hepatopâncreas; DIVERT : divertículo; E : estômago; C : ceco e I : intestino) em indivíduos amostrados antes da alimentação (AA) e em indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). | 69 |

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CCMAR- UAAlg: centro de ciências do mar da universidade do Algarve.

CIMA-UAAlg: centro de ciências do mar e do ambiente da universidade do Algarve

DGVA: direção geral de alimentação e veterinária

DNA: ácido desoxirribonucleico

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

IPTG: isopropil β – D - thiogalactopiranoside

LB-agar: Luria Bertani-agar

LCA – Lowest common ancestor, também traduzido como menor antepassado comum

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NJ: Neighbor-Joining

PCR: reação em cadeia da polimerase

PCoA: análise de coordenadas principais

rpm: rotações por minuto

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal

TAE: Solução tamponizada de Tris base, ácido acético e EDTA

Taq: *Thermophilus aquaticus*

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

UV: radiação ultra-violeta

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D- galactopiranosídeo

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Contextualização

O trato digestivo é um ecossistema natural que alberga um complexo e dinâmico consórcio de microrganismos, definido como *microbiota* que podem colonizar a mucosa gastrointestinal (autóctones) ou estar presentes em períodos variáveis no espaço luminal (alóctones) (Banerjee e Ray, 2016; Ringo *et al.*, 2016; Navarrete *et al.*, 2008, 2014; Nayak, 2010). Adicionalmente, na hemolinfa dos invertebrados tem sido reportada a existência de comunidades microbianas, apesar de haver indicações de que o sistema circulatório dos animais saudáveis, principalmente dos vertebrados superiores seja virtualmente estéril (Wang e Wang, 2015). No entanto, a existência e função de uma microbiota no trato digestivo e no sistema circulatório dos animais aquáticos foi motivo de inúmeras controvérsias, devido ao contato direto com a água e porque a maior parte dos microrganismos presentes em ambientes naturais, como é o caso do trato digestivo e hemolinfa, não serem cultiváveis com os métodos convencionais (Ringo *et al.*, 2016). Atualmente foram desenvolvidos e têm sido usados diferentes métodos moleculares que permitem explorar a diversidade e as potencialidades das comunidades bacterianas no trato digestivo e sistema circulatório dos invertebrados marinhos, principalmente, nos de interesse na aquacultura.

Nos últimos anos, o interesse pelo cultivo dos cefalópodes, com destaque para o polvo (*Octopus Vulgaris*) e o choco (*Sepia officinalis*), tem vindo a aumentar, principalmente nos países mediterrâneos, devido à sua importância económica como fonte de proteína para consumo humano. Domingues *et al.*, (2002) e Ferreira *et al.*, (2009), afirmam que os cefalópodes são espécies promissoras na indústria da aquacultura porque possuem (1) alta taxa de crescimento; (2) ciclo de vida curto que garante a disponibilidade dos animais de tamanho comercial em menos tempo; (3) altas taxas de crescimento e de sobrevivência da progénie; (4) ovos grandes que facilitam o transporte e o manuseamento; (5) aparente resistência a doenças em aglomerado populacional; (6) rápida adaptação a domesticação e as condições de cativeiro; (7) facilidade de reprodução em cativeiro. Existe ainda um interesse adicional no cultivo, pois os cefalópodes têm sido utilizados como modelos experimentais excepcionais, principalmente nas neurociências e fisiologia animal (Vidal *et al.*, 2014; Bedore *et al.*, 2015; Collins *et al.*, 2012) pelo fato de

apresentarem (1) cérebro multi-lobular; (2) sistema circulatório fechado e de alta pressão com certas semelhanças ao dos vertebrados; (3) órgãos sensoriais desenvolvido que lhes permite ter alta sensibilidade à parâmetros ambientais e (4) elevada taxa metabólica (Gestal e Castellanos-Martínez, 2015; Le Pabic *et al.*, 2014).

O cultivo dos cefalópodes para a economia e diversificação das fontes de proteína animal para alimentação, e o seu uso como modelos de investigação, dependem da sua manutenção em cativeiro de todos os estádios de vida. No entanto, para o caso do choco o sucesso tem sido limitado pela existência de poucas alternativas nutricionais e dos custos elevados para obtenção dos alimentos palatáveis (Ferreira *et al.*, 2009 e Sykes *et al.*, 2017). A alimentação, segundo Sykes *et al.*, (2017) é feita, geralmente, com base em alimentos vivos compostos por crustáceos, bivalves ou peixes pequenos. Neste momento, a formulação de rações equilibradas é um dos principais desafios, senão o principal, para o desenvolvimento da aquacultura sustentável dos cefalópodes em geral e do choco em particular. Numa aproximação estratégica diferente, Li *et al.*, (2012) admitem ser economicamente mais vantajoso manipular a microbiota em animais aquáticos pela aplicação de prebióticos na dieta. Esta estratégia, poderá alterar as condições do trato gastrointestinal favorecendo certas espécies bacterianas para consequentemente aumentar a eficiência do crescimento e a resistência a doenças do hospedeiro.

1.2. Caracterização da *S. officinalis*: ecologia, anatomia e fisiologia

A *Sepia officinalis*, comumente conhecida por choco, é uma espécie demersal e nerítica que no ambiente natural, ocorre principalmente nos fundos arenosos e lodosos. A sua distribuição abrange desde o litoral até cerca de 200 m de profundidade, sendo mais predominantes nas profundidades superiores a 100 m (FAO¹), são tolerantes a águas salobres e os indivíduos mais jovens toleram melhor as salinidades mais baixas e a instabilidade ambiental do que os adultos (Reid *et al.*, 2005).

O choco tem uma vida tanto diurna quanto noturna, alimentando-se de uma grande variedade de presas, incluindo crustáceos, moluscos, poliquetas, pequenos peixes demersais e servem de alimento de tubarões, peixes demersais e outros cefalópodes (Barratt e Allcock, 2012). Apesar da sua abundância no leste do Atlântico, costa

¹ Disponível em <http://www.fao.org/fishery/species/2711/en>

oeste de África e no mar Mediterrâneo, a *S. officinalis* é uma espécie relativamente pouco explorada, e a sua exploração é mais comum no oriente do Atlântico. Atualmente, a espécie é alvo de pesca dirigida no Nordeste da Europa com destaque para França, Portugal e Espanha, assim, tem aumentado a demanda do consumidor, levando o desenvolvimento da pesca a nível mundial e seguidamente da tentativa da aquacultura (Arkley *et al.*, 1996).

O choco apresenta uma organização anatômica especializada e complexa em relação aos outros grupos pertencentes aos moluscos. Possui um corpo oval com a parte posterior e suas barbatanas arredondadas, cerca de dez tentáculos (oito pequenos e dois longos) em volta da sua boca. As características que marcam esta espécie são: (1) capacidade de camuflar, devido a presença de células chamadas cromatóforos localizados na pele, que por contração dos músculos nervosos, regulam o tamanho dessas células, permitindo que o animal mude de cor; (2) mecanismo de defesa, expõem uma tinta negra que lhes permitem escapar de predadores (Barratt e Allcock, 2012, Bedore *et al.*, 2015).

Em termos anatômicos, o trato digestivo do choco (fig. 1.1A) é constituído por uma rádula delimitada por lábios circulares (com papilas) onde se encontram um par de mandíbulas fortes que ajudam a cortar o alimento em pequenos pedaços. Após o processamento do alimento na boca este é encaminhado para o tubo central ou esófago que conecta a boca e o estômago. No estômago, o alimento recebe o suco digestivo que é um produto de secreção das glândulas salivares, que se apresentam como um par anterior que produzem muco e um posterior que pode mostrar tendência à fusão e produzir muco, enzima digestiva e.g. protéase e aminas indólicas e fenólicas. Os nutrientes solúveis ligados à enzima descem para o estômago, onde, pela ação de dois conjuntos de glândulas digestivas ou hepatopâncreas são adicionadas enzimas digestivas. Esta adição pode ser feita de forma separada ao estômago ou ao ceco, uma estrutura anatômica com identidade própria, mas ligado diretamente ao estômago. Assim, as proteínas fibrilares e outras macromoléculas são degradadas até a formação do quimo. Este é separado pelo ceco e transferido para o intestino que é um tecido tubular de pouco diâmetro, adjacente ao estômago e que termina no reto. Os nutrientes são dissolvidos e absorvidos pela pinocitose pelas células do hepatopâncreas, onde ocorre a digestão intracelular. Esse processo pode no total demorar entre 4 e 8 horas, dependendo do tamanho do animal e da refeição

assim como da temperatura ambiental. Por fim, os resíduos não digeridos são eliminados pelo ânus (Vidal *et al.*, 2014; *National Aquarium in Baltimore*²)

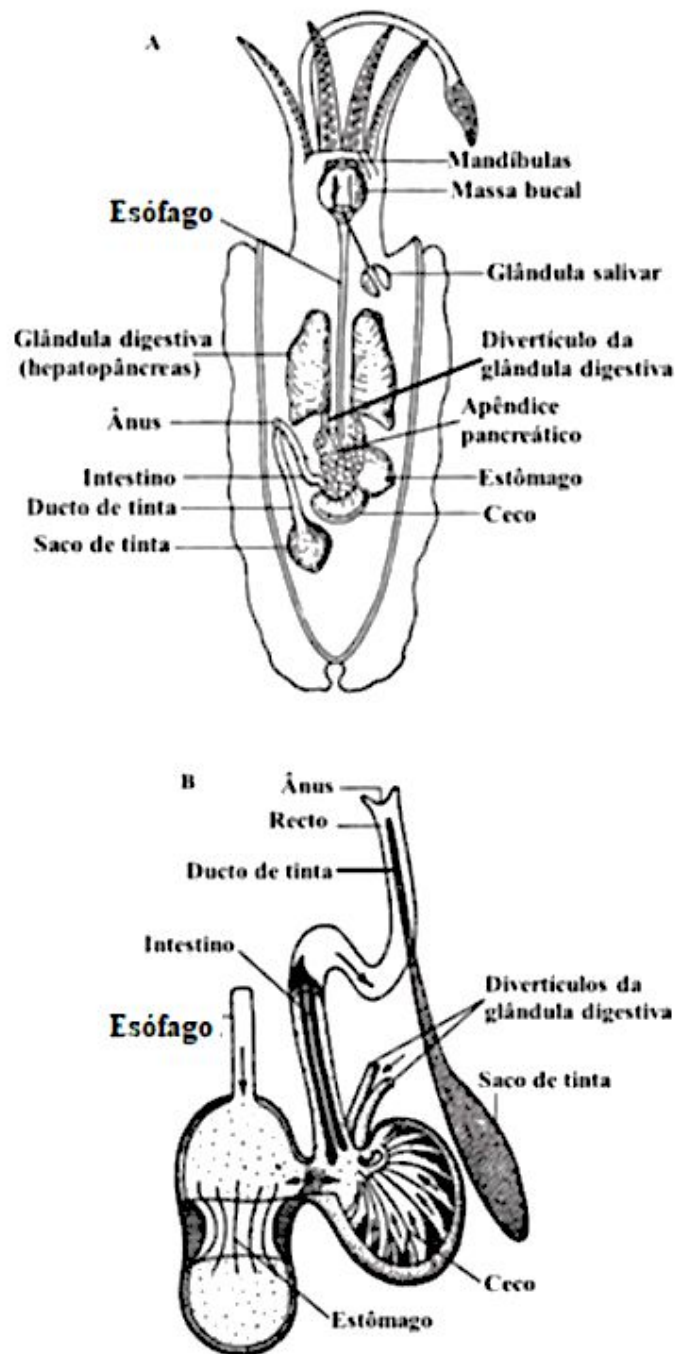


Figura 1.1. Sistema digestivo do choco (*S. officinalis*). A. Anatomia do sistema digestivo, B. relação entre estômago, ceco e saco de tinta (Adaptado de Parker e Haswell, 1972).

² Disponível em static.elmeme.me/jur-93/squid-dissection-lab-answers.pdf, acessado em 12.6.2018

O choco apresenta um sistema circulatório bem desenvolvido, constituído de três corações conectados por um sistema vascular (veias e artérias) complexo (fig. 1.2). Dois dos corações são branquiais e bombeiam a hemolinfa para as respectivas brânquias (direita/esquerda). O terceiro coração, o coração sistémico, recebe a hemolinfa das brânquias para a distribuir pelos os tecidos periféricos em diversas partes do corpo. A hemolinfa (sangue nos vertebrados) apresenta um tom azul-esverdeado devido a presença da hemocianina contendo cobre (e não ferro como a hemoglobina dos vertebrados) para ligar e transportar oxigénio que é drenado para os corações branquiais através das veias cavas anterior e lateral. Existem também, dentro das brânquias, vasos branquias aferentes, que transportam a hemolinfa de volta para o ventrículo, e o coração sistémico bombeia para fora do coração³. A hemolinfa contém hemócitos, células hemolinfáticas, que tanto quanto se sabe estão envolvidas em várias funções, desde a digestão de nutrientes, transporte e excreção, até a reparação de lesões e respostas imunológicas (Gestal e Castellanos-Martínez, 2015).

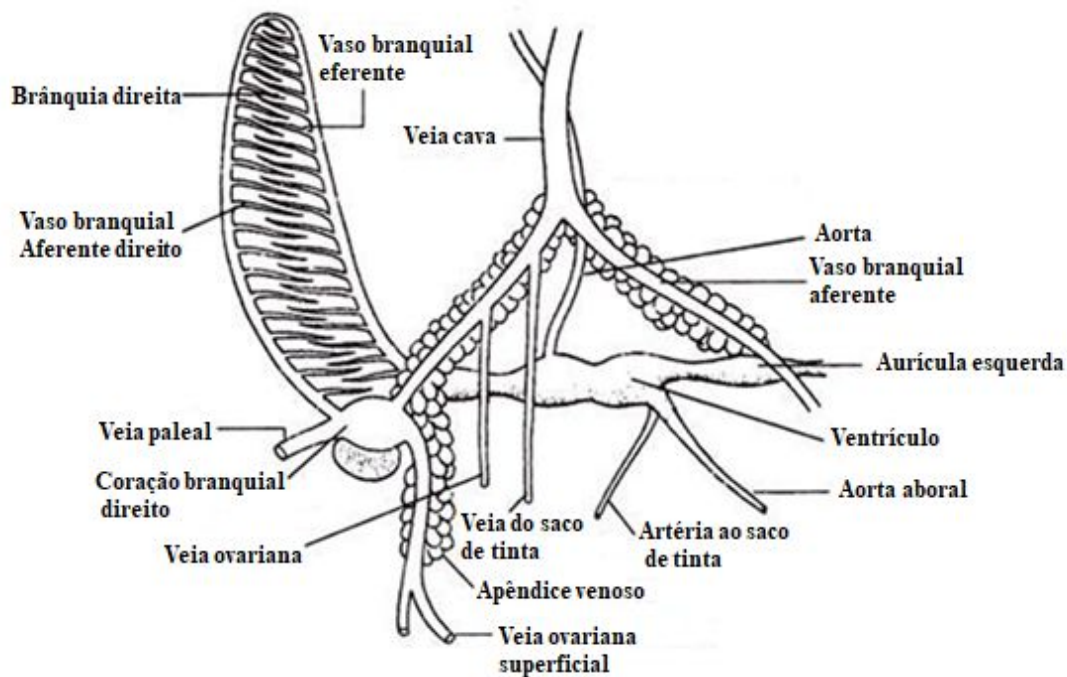


Figura 1.2. Anatomia do sistema circulatório do choco (*S. officinalis*) (adaptado de Parker e Haswell, 1972).

³ Informação disponível em <https://study.com/academy/lesson/cephalopod-circulatory-system.html> & http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Cuttlefish#Circulatory_system_and_locomotion acessado em 16.08.2018

O choco, como os outros cefalópodes, são o grupo de maior complexidade anatômica dentro do grupo dos moluscos, com uma fisiologia digestiva que partilha alguma semelhança anatômica e funcional com os peixes. No entanto, e em contraste com os peixes, nos cefalópodes a digestão intracelular acontece em todos os estádios do seu ciclo de vida junto com a digestão extracelular. A combinação dos dois tipos de digestão esta provavelmente ligada à performance do seu sistema digestivo em termos de desempenho e eficiência. Permitindo um rápido crescimento do animal devido a melhor assimilação dos nutrientes. A eficiência é atribuída as glândulas digestivas e suas múltiplas funções na digestão, incluem a secreção enzimática, absorção de moléculas e digestão intracelular (Karasov *et al.*, 2011; Vidal *et al.*, 2014; Safi *et al.*, 2017). Ainda no contexto alimentar e digestivo, recentemente Lamare *et al.*, (2016) confirmaram que os cefalópodes não armazenam grandes quantidades de lípidos e carboidratos como substâncias de reserva, e aparentemente são os triglicerídeos que se encontram presentes nas glândulas digestivas que servem como fonte energética a curto prazo durante a limitação de alimentos.

1.3. Colonização da microbiota ao sistema digestivo e circulatório dos animais aquáticos

Os oceanos são grandes sistemas ecológicos que albergam diversas comunidades microbianas marinhas que estão envolvidas em diversos processos evolutivos locais de adaptação fisiológica sob a influência de uma variedade de condições ecológicas e pressão seletiva (Glöckner *et al.*, 2012). Sendo que os animais aquáticos estão em contacto direto com a água ficam expostos a diversos microrganismos que segundo Austim (2006) e Troussellier *et al.*, (2017) podem colonizar a superfície externa do animal, assim a colonização do trato digestivo e do sistema circulatório pelos microrganismos ocorre por meio de ingestão de alimentos e água.

Consequentemente, uma das questões fundamentais que tem vindo a ser colocada é o mecanismo pelo qual a microbiota coloniza o sistema digestivo e circulatório. Romero *et al.*, (2014) afirmam que a colonização da microbiota pode efetivar-se desde o estágio larval, mas os autores propõem que a colonização seja complexa e dependente das comunidades microbianas existentes na água onde os ovos são depositados, e dos alimentos vivos que ingerem após a eclosão. Assim, propõem que uma colonização continua durante o desenvolvimento do animal, de forma que tanto

o número como a diversidade dos microrganismos durante o estágio larval e alimentação são os fatores fundamentais que influenciam a microbiota do animal adulto.

Wang *et al.*, (2017) e Romero e Navarrete (2006) utilizando técnicas não dependentes de cultivo e a comparação destas com as dependentes do cultivo, corroboraram que a microbiota do trato digestivo se institui após a eclosão e a sua estabilização ocorre após os primeiros estádios de alimentação e ainda que os seus principais componentes são adquiridos do ambiente da eclosão. Nos cefalópodes, e em particular na lula, tem se tentado demonstrar a existência de transferência direta do microbioma materno para os ovos, ponto que tem gerado alguma controvérsia, porque afinal os ovos são depositados nos mesmo ambiente do qual a lula adquiriu o seu consórcio bacteriano e, assim o mesmo processo deve ser assumido acontecer nos ovos (Devidson, 2017).

A composição da microbiota central do trato digestivo é considerada essencialmente estável ao longo da fase adulta, mas, existem componentes que são dinâmicos. Biológica e metabolicamente existem fatores que podem alterar a composição das comunidades bacterianas e influenciam o risco de saúde ou doença do hospedeiro. Entre estas componentes podem ser mencionados como tendo especial relevância o estresse ambiental ou mudanças na dieta (Nicholson *et al.*, 2012). Assim, apesar de se verificar uma grande estabilidade da microbiota na fase adulta, esta pode ser perdida dependendo da interação ecológica com o hospedeiro (Smith *et al.*, 2015). Enquanto que a colonização da hemolinfa pela microbiota pode ser condicionada pelo fato deste local conter certas substâncias que podem ou não inibir a sua proliferação, como foi demonstrado em *Marsupenaeus japonicus* em que uma lectina do tipo C, MjHeCL e uma profenoxidase parecem ser importantes para a homeostasia entre o hospedeiro e sua microbiota na hemolinfa (Wang *et al.*, 2014; Fagutao *et al.*, 2009).

Com base nos cenários acima descritos, Austin (2006) descreveu a existência de três prováveis situações de colonização dos microrganismos ao hospedeiro: (1) os microrganismos do ambiente aquático e que se encontram ao redor do animal podem ficar intimamente associados e até colonizar a sua superfície externa; (2) os microrganismos podem entrar através boca com água ou alimentos e passar a colonizar o trato digestivo; e (3) os microorganismos que entram em contato com as

superfícies podem ser inibidos pela microbiota residente ou por compostos inibitórios naturais presentes no animal. Assim, existe uma ligação estreita entre a microbiota do hospedeiro e do ambiente, sendo que os animais aquáticos participam da manutenção de táxons ambientais raros e vice-versa (Troussellier *et al.*, 2017).

1.4. Fatores que influenciam a colonização da microbiota nos animais aquáticos

A composição e a atividade da microbiota gastrointestinal evoluem em equilíbrio com o hospedeiro desde a fase larval e estão sujeitas a uma interação complexa. A microbiota intestinal depende de fatores bióticos e abióticos, sendo sensível a mudanças da dieta ou do estado nutricional do animal, podendo ser modulada pela variação do ciclo de vida, estado de saúde, condições de cultivo, fatores ambientais e ecológicos (Banerjee e Ray, 2017; Piazzon *et al.*, 2017; Ringo *et al.*, 2016; Nicholson *et al.*, 2012). Conseqüentemente, para os animais em cativeiro, a colonização da microbiota e suas conseqüências para o estado de saúde, são dependentes da gestão das condições ambientais e sanitárias. No entanto Banerjee e Ray (2017) assinalam o equilíbrio da microbiota que pode garantir a vitalidade do hospedeiro como fator fundamental. Por tanto, a eficiência e sustentabilidade nos sistemas de cultivo dos animais aquáticos pode ser significativamente influenciado pela composição microbiana da espécie (Cornet *et al.*, 2015).

Estudos relativamente recentes de Roeselers *et al.*, (2011) e Romero *et al.*, (2014) mostraram que o estado do hospedeiro é importante na definição da microbiota do trato gastrointestinal dos animais aquáticos. Assim, foram apresentadas evidências da existência de uma microbiota residente nos peixes, embora podem existir duas possibilidades: a primeira, as comunidades microbianas do trato gastrointestinal são moldadas pela composição da comunidade presente no meio ambiente local, a segunda, é moldada por pressões seletivas que ocorrem dentro do próprio trato gastrointestinal do hospedeiro. Assim, Ni *et al.*, (2013) demonstraram que a separação temporal e espacial de animais do seu habitat natural pode resultar em diferenças importantes na composição da microbiota gastrointestinal em comparação com hospedeiros selvagens, e ainda, que os animais selvagens podem ter comunidades microbianas gastrointestinais semelhantes as dos animais criados em cativeiro em diferentes instalações.

Por exemplo, na comparação entre peixe zebra selvagem e domesticado, os resultados indicaram não existirem diferenças significativas na variação de táxones dominantes da microbiota intestinal (Roeselers *et al.*, 2011). Assim, os autores concluíram que apesar de diferenças de habitats entre peixe zebra selvagem e domesticado, os animais apresentam uma microbiota comum, sugerindo que as características intestinais do peixe zebra selecionam táxones específicos. Mas também, segundo Romero *et al.*, (2014), a influência da microbiota no hospedeiro pode não só ser derivada da composição da comunidade microbiana ou das atividades expressas por esses microrganismos, pois outros fatores poderiam estar envolvidos como adaptações específicas do hospedeiro.

Portanto, as características da microbiota estão dependentes das condições do trato gastrointestinal determinadas por parâmetros específicos da espécie, como anatomia, entradas endógenas de secreções digestivas, pH, osmolaridade, potencial redox, tamanho do compartimento e estrutura, taxa de passagem e tempo de residência (Ringo *et al.*, 2016).

1.5. O papel da microbiota do trato digestivo e hemolinfa nos animais aquáticos

O trato digestivo e a hemolinfa são ecossistemas complexos e dinâmicos constituídos por microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios obrigatórios que formam relações simbióticas com diversos invertebrados como por exemplo esponjas, corais, cefalópodes, crustáceos ou vertebrados como mamíferos ou peixes, interagindo com os seus respectivos hospedeiros ou com outros elementos da própria microbiota. Portanto, esse consórcio entre os animais marinhos e as comunidades microbianas são sistemas-modelo para compreender a interação complexa entre os microrganismos e as células hospedeiras, e podem fornecer informações relevantes sobre o desenvolvimento de doenças humanas e identificação de novos alvos de drogas (Cornet *et al.*, 2015).

A evolução das ferramentas moleculares, com destaque para a detecção e sequenciamento de informação do gene 16S RNA ribossomal têm revelado uma contribuição importante das comunidades microbianas no trato digestivo e na hemolinfa dos invertebrados, com implicações na saúde, metabolismo, imunologia, fisiologia (Levy *et al.*, 2017; Wong e Rawls, 2012; Givens *et al.*, 2015; Nayak, 2010, Barouei *et al.*, 2012).

Defere *et al.*, (2013) defendem que a microbiota associada a hemolinfa tem sido explorada para a atividade antibacteriana contra agentes patogénicos da aquacultura, desempenhando um papel na defesa dos invertebrados marinhos. Por outro lado, pesquisas sobre as comunidades microbianas da hemolinfa e a sua homeostasia com o seu hospedeiro devem ser realizadas para revelar a patogenicidade dos microrganismos, a imunidade do hospedeiro e a possível utilização no controle de doenças (Wang e Wang, 2015)

No seu conjunto a microbiota pode estar parcialmente envolvida na digestão e absorção dos nutrientes, manutenção e funcionalidade efetiva da mucosa intestinal e da proteção contra a colonização de microrganismos patogénicos, fornecendo nichos para aderência, colonização e proliferação de espécies microbianas mutualísticas e comensais (Dimitroglou *et al.*, 2011; Giatsis, 2016; Giatsis *et al.*, 2014; Banerjee e Ray, 2017, Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Ainda, Karasov *et al.*, (2011) afirmam que o desempenho do trato gastrointestinal dos animais, tanto vertebrados como invertebrados, é determinado pelo próprio genoma e pela interação desse genoma com o ambiente, mas, a composição e diversidade das comunidades microbianas é um fator importante no seu funcionamento, sendo que esta complementaridade resulta da caracterização molecular da diversidade microbiana.

Neste sentido, estudos realizados em peixe zebra (Bates *et al.*, 2006; Rawls *et al.*, 2004; Rawls *et al.*, 2006) concluíram que a resposta específica ao nível de expressão genica estava condicionada pela composição da microbiota no trato digestivo. Portanto, a comunidade microbiana está envolvida em diversas funções no hospedeiro, e essas funções são desempenhadas, segundo Levy *et al.*, (2017) através de mudanças de pequenas moléculas entre o lúmen gastrointestinal e a superfícies da mucosa do hospedeiro, podendo sintetizar, modular, degradar pequenas moléculas, providenciando a complementação funcional para as capacidades metabólicas do hospedeiro. Especificamente, como afirmam Piazzoni *et al.*, (2017) a microbiota pode, no seu conjunto, metabolizar componentes da dieta que não podem ser metabolizados pelo hospedeiro, em pequenas cadeias de ácidos gordos, ou carboidratos complexos (Nicholson *et al.*, 2012. Além disso, o metagenoma da comunidade microbiana contribui para a produção de metabolitos primários e na modulação dos metabolitos secundários que afetam a fisiologia do hospedeiro.

Várias destas vias metabólicas têm sido associados com a fisiologia do hospedeiro, incluindo a produção dos ácidos gordos, vitaminas, aminoácidos, metabolitos neuroativos, com efeitos benéficos na homeostase epitelial, desenvolvimento de células imunes e regulação neuronal até digestão de nutrientes (Levy *et al.*, 2017). O hospedeiro deteta como sinal a produção desses metabolitos e, desenvolve mecanismos de respostas dependendo do tipo de metabolito, por exemplo, havendo produção do butirato, o animal desenvolve resposta que fortalece a barreira epitelial (Estensoro *et al.*, 2016), reduzindo a inflamação e aumentando a produção de mucinas e peptídeos antimicrobianos (Piazzon *et al.*, 2017).

Desde um ponto de vista global a compreensão dos processos de interação entre os microrganismos e o hospedeiro deve primeiramente, identificar a comunidade microbiana, o que levará à otimização de estratégias para manipular a microbiota do trato digestivo e da hemolinfa no choco, garantindo o bem-estar dos animais.

1.6. Efeito da dieta sobre a microbiota dos animais aquáticos

Nos últimos anos, o interesse pelo estudo da microbiota do trato digestivo e hemolinfa dos animais aquáticos tem vindo a se destacar, centrando-se na influência de diversos fatores para compreensão da diversidade e composição taxonómica das comunidades microbianas. Segundo Piazzon *et al.*, 2017 e Ringo *et al.*, 2016, de entre vários fatores estudados, a microbiota do trato digestivo é modulada pela suplementação da dieta. No entanto, existem escassos estudos que analisem a suplementação da dieta nos invertebrados marinhos no geral e, ainda menos nos cefalópodes em particular. A maior parte dos estudos que analisam a influência da suplementação da dieta sobre as comunidades microbianas foram realizados em vertebrados, nomeadamente em peixes sobretudo naqueles com interesse para aquacultura.

Estudos anteriores apresentam evidências de uma forte ligação entre a composição, quantidade e qualidade do alimento, e a microbiota do trato digestivo do organismo. Revelando assim que as mudanças alimentares ou o consumo de diferentes recursos durante estágios do ciclo de vida dos animais marinhos podem alterar a diversidade microbiana no trato digestivo do organismo (Zhao *et al.*, 2012). Assim, com base nesses estudos que analisam a suplementação da dieta com diversas composições físico-químico foi demonstrado que a comunidade microbiana no trato digestivo pode

ser dividida em autóctones (aderente ou indígena), capazes de colonizar a mucosa gastrointestinal e estão associados a *microvili*, e alóctones (transiente), considerados de vida livre que estão associados a partículas alimentares ou presentes no lúmen (Banerjee e Ray, 2016; Ringo *et al.*, 2016; Nayak, 2010), sendo que os alóctones, segundo Dehler *et al.*, (2017) não colonizam o trato gastrointestinal devido a falta de competência e ou a composição mista das bactérias.

1.7. 16S rRNA: Ferramenta molecular para a caracterização do microbioma

Numerosos estudos recentes na literatura têm usado o 16S rRNA (16S) como ferramenta molecular fundamental para determinar o perfil da microbiota intestinal (Kuczynski *et al.*, 2012) Estes estudos realizados tanto em humanos como noutros vertebrados têm estado focados tanto em doenças e.g. microbiota associada a progressão do cancro colo rectal como a modificações da microbiota resultante de modificações na dieta.

A grande vantagem da utilização do 16S e primeiramente que esta presente em todas as bactérias e archaea, e segundo a sua organização estrutural esta altamente conservada. Assim, o 16S está organizado em 9 regiões de sequência variável (V1 a V9) que contem informação taxonómica. A sua utilização, requer amplificação da amostra por PCR, e a sequenciação dos fragmentos individuais permite construir um cladograma taxonómico para estabelecer a estrutura populacional da microbiota, utilizando ferramentas computacionais open-source desenvolvidas *ad hoc* para esta aproximação experimental e.g. MEGAN (Huson 2016).

1.8. A escassa informação do microbioma dos cefalópodes

Estudos realizados para a compreensão do microbioma dos cefalópodes foram realizados, na sua maior parte, na glândula nidamental das lulas (*Euprymna scolopes*), usando como alvo o gene que codifica para 16S RNA ribossomal, e os resultados sugerem a presença de Rhodobacterales, Verrucomicrobia ou Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes (Collins *et al.*, 2012; Picho *et al.*, 2007; Davidson, 2017).

No trato digestivo, um estudo comparativo foi realizado em paralarvas de polvo *Octopus vulgaris* selvagem e em cativeiro, que visava analisar a influencia da dieta sobre as comunidades microbionas. Os resultados mais destacados mostraram que

nos animais mantidos em cativeiro com artemia existia uma diminuição da diversidade bacteriana. Especialmente após o quinto dia, quando quase metade das espécies bacterianas presentes no dia 0 foram perdidas e duas famílias bacterianas *Mycoplasmataceae* e *Vibrionaceae* dominaram a comunidade microbiana. Enquanto a diversidade bacteriana nas paralarvas selvagens aumentou. Um dado interessante do estudo mostra que não existem diferenças nas comunidades microbianas para as paralarvas selvagens e em cativeiro quando alimentados com Zooplâncton (Roura *et al.*, 2017).

Desafortunadamente até ao momento ainda não foram realizados estudos que avaliem as comunidades microbianas no choco (*Sepia officinalis*). Existe apenas um “pre-print” (Lutz et al) no sistema Biorxiv, más que não está publicado que analisa o microbioma do choco. (<https://www.biorxiv.org/content/early/2018/10/11/440677>).

OBJETIVOS

Apesar do seu promissor potencial para o cultivo comercial e como modelo em investigação científica a diversidade e composição taxonômica da microbiota do trato digestivo e hemolinfa do choco, não foi caracterizado. Em consequência, este trabalho tem como objetivo principal obter informações do microbioma bacteriano associado ao sistema digestivo e circulatório do choco (*Sepia Officinalis* Linnaeus, 1758).

Para o alcance do objetivo principal foram traçados os seguintes objetivos específicos: i) identificar os grupos bacterianos associados à hemolinfa e às diferentes regiões anatómicas do trato digestivo nomeadamente hepatopâncreas, estomago, ceco, intestino, divertículo e esófago; ii) comparar a estrutura taxonômica das comunidade bacteriana entre os indivíduos; iii) estimar a diversidade da microbiota bacteriana associada a hemolinfa e trato digestivo; e iv) testar o efeito putativo da alimentação sobre a microbiota bacteriana associada à hemolinfa e intestino;

CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Proveniência dos animais e colheita das amostras

Os animais usados para esta pesquisa foram obtidos da Estação Marinha do Ramallete (CCMAR- UAlg). Todos os procedimentos de manuseamento dos animais (manutenção, remoção do tanque de cultura e processo de eutanásia) foram realizados por investigadores do CCMAR licenciados para experimentação animal pela DGVA. A anestesia dos animais foi levada a cabo por imersão em água salgada com 200 mM MgCl₂ até imobilização total dos animais. A occisão foi efetuada por destruição dos gânglios cefálicos com ferramenta adequada.

Os animais amostrados para este trabalho encontravam-se no mesmo tanque de cultivo, colocado no exterior da estação do Ramallete, num regime de alimentação com camarinha congelada, fornecida uma vez ao dia, às 12:00. Foram amostrados 3 animais antes do período de fornecimento da alimentação (entre as 10:00 e as 10:30) daqui em diante referidos como AA, e 3 animais após o fornecimento da alimentação (entre as 14:00 e as 14.30), daqui em diante referidos como DA.

A disseção dos animais AA e DA foi feita sobre um tabuleiro com gelo e com material de disseção esterilizado (fig. 2.1A e fig. 2.1B) e cada amostra recolhida foi imediatamente guardada em tubo Eppendorf de 1.5 ml esterilizado. Assim, e após exposição dos órgãos internos e remoção do saco de tinta, de cada animal foi imediatamente extraída a hemolinfa dos corações branqueais (HL), com uma seringa estéril (fig. 2.1C), a que se seguiu a colheita de amostras do Esófago ou tubo central (TC), Hepatopâncreas (HP), dos dois divertículos do hepatopâncreas (DIV), do estômago (E), do ceco (C) e do Intestino (I). As amostras, mantidas em gelo, foram imediatamente processadas para se efetuar a extração de DNA.

2.2. Extração e amplificação do DNA bacteriano por PCR

A extração do DNA foi feita usando o kit comercial, E.Z.N.A.[®] *Stool DNA Kit Pathogen Detection Protocol* (Omega Bio-Tek, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi conservado a -20°C até ser usado.

Cada amostra de DNA obtida, num total de 27, foi sujeita a PCR tendo como alvo o gene codante da subunidade 16S do rRNA. Para tal foi usado o par de primers 27F e 534R (tabela 2.1), que permitiu amplificar um fragmento de cerca de 507 bp contido nas regiões hipervariáveis V1 a V3 (fig. 2.2). A seleção das regiões a amplificar e do par de primers a usar para este trabalho teve por base a consulta de estudos publicados, em que foram determinados microbiomas de animais aquáticos (ver Piazzon et al., 2017 e referências neste artigo).

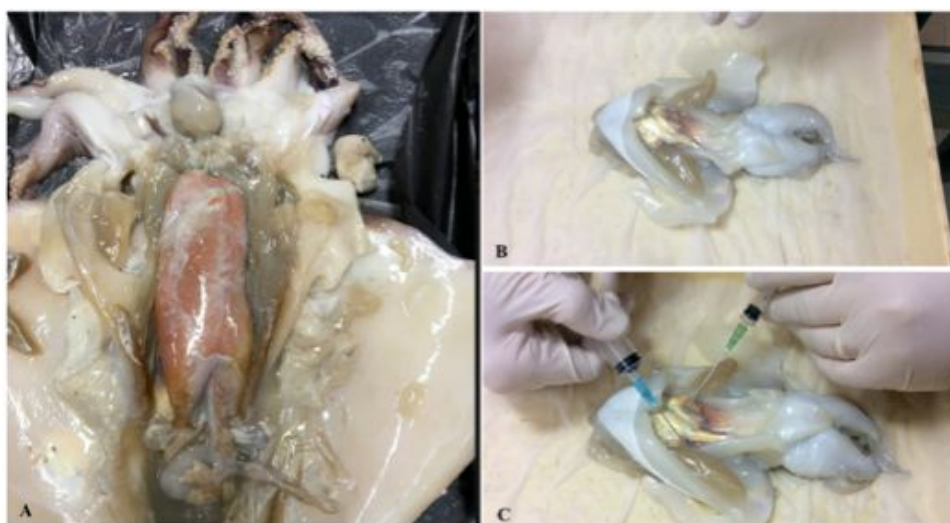


Figura 2.1. Dissecção do choco. A e B: dissecção mostrando os órgãos internos do choco e C: local onde foi extraída a hemolinfa.

Cada amostra de DNA extraída foi sujeita a PCR, num volume final de 50 μ l de reação, com os seguintes reagentes: 5 μ l de tampão de DreamTaq 10X, 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 200 nM de cada primer, 1U de DreamTaq™ DNA Polimerase (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*, USA), DNA entre 2 a 5 μ l e H_2O estéril para perfazer 50 μ l. As reações do PCR foram realizadas num termociclador *UNO-Thermoblock* (Biometra, Alemanha) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos com: desnaturação a 94°C por 30s; hibridação dos primers a 53°C por 30s e extensão a 72°C por 30s. As reações foram finalizadas com extensão a 72°C por 5 min. Cada conjunto de reações de PCR incluiu três controlos negativos (sem o DNA) e um controlo positivo para o qual foi usado uma colónia de *Escherichia coli* diretamente da placa de cultura com LB-agar. Os produtos de PCR foram visualizados sob luz UV (*Scientific Instruments*, Itália), após

eletroforese em gel de agarose (1,5% em TAE 1 X) e coloração do gel com brometo de etídio.

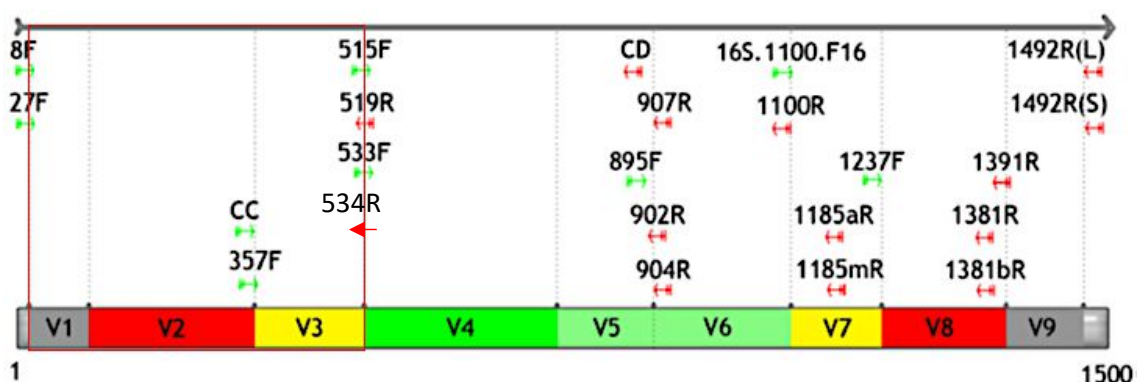


Figura 2.2. Mapa dos *primers* universais, disponíveis na literatura, para o gene 16S rRNA e as respectivas regiões hipervariáveis. Dentro do quadrado vermelho estão representadas as regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA amplificadas neste trabalho com o par 27F e 534R (esquema adaptado de Yang *et al.*, 2016).

Tabela 2.1: *Primers* usados para amplificação das amostras de DNA bacteriano e das colônias recombinantes.

| <i>Primer</i> | Sequência (5' - 3') | Referência |
|---------------|----------------------------|---------------------------------|
| 27F | AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG | usados por Piazzon et al., 2017 |
| 534R | ATT ACC GCG GCT GCT GG | usados por Piazzon et al., 2017 |
| M13F | GTA AAA CGA CGG CCAG | Manual do vetor p-GEM |
| M13R | CAG GAA ACA GCT ATG AC | Manual do vetor p-GEM |

2.3. Clonagem e Transformação

O produto de amplificação (DNA dador) das amostras HL, HP, TC, DIV, E, C e I dos 3 indivíduos AA e das amostras HL e I dos 3 indivíduos DA foram ligados ao vetor de clonagem usando o kit comercial *pGEM®-T Easy System I* (Promega, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O estudo do microbioma dos indivíduos DA centrou-se assim nas amostras HL e I, pelo que, embora amplificadas, as restantes amostras não foram processadas. Cada ligação foi armazenada a 4°C durante a noite para posterior transformação. No dia seguinte a ligação foi usada para transformação

das células de *Escherichia coli* competentes (estirpe XL1Blue), preparadas no laboratório e armazenadas em DMSO a -80°C. As células foram rapidamente descongeladas e colocadas 10 min em gelo. Findo este período, a cada 100 µl de células competentes foram adicionados 5µl de ligação. Após 30 min de incubação em gelo as células foram sujeitas a choque térmico de 42°C durante 45s, seguido da adição de 250µl de SOC (LB líquido com 20 mM de glucose) previamente aquecido a 37°C. Seguiu-se um período de 45 min de incubação a 37°C com agitação a 200 rpm (*Inkubator* 1000 e *Unimax* 1010, *Heidolph Instruments*, Alemanha). Finalmente foram adicionados 5µl de IPTG 1M a cada transformação e as células foram imediatamente plaqueadas em placas de Petri contendo LB-Agar com 25µg/ml de ampicilina à superfície das quais se espalhou previamente 40µl de X-Gal a 20mg/ml. Obtiveram-se duas placas por cada transformação, as quais foram incubadas durante a noite a 37°C.

No dia seguinte, as colónias com coloração branca (recombinantes de interesse), obtidas para cada transformação, foram repicadas, usando palitos de madeira esterilizados, para uma nova placa contendo LB agar com 25µg/ml de ampicilina e incubadas a 37°C durante a noite.

2.4. Análise das colónias recombinantes.

A análise dos recombinantes de interesse foi feita através de amplificação por PCR. De cada transformação foram amplificadas entre 32 e 64 colónias. Para tal utilizou-se um palito de madeira esterilizado para transferir parte da colónia repicada para um volume de reação de 50 µl, contendo os seguintes reagentes: 5µl de tampão de DreamTaq 10X, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 200 nM de primer M13F e 200 nM de primer M13R, 1U de DreamTaq™ DNA Polimerase (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*, EUA) e H₂O estéril para perfazer 50 µl. Os primers utilizados têm os respetivos locais de hibridação no plasmídeo pGEM flanqueando o local de inserção do DNA dador.

As reações do PCR foram realizadas num termociclador *UNO-Thermoblock* (Biometra, Alemanha) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 30 ciclos com: desnaturação a 94°C por 30s; hibridação dos primers a 60°C por 30s e extensão a 72°C por 30s. As reações foram finalizadas com

extensão a 72°C por 5 min. Cada conjunto de reações de PCR incluiu um controle negativo (sem DNA). Os produtos de PCR foram visualizados sob luz UV (*Scientific Instruments*, Itália), após eletroforese em gel de agarose (1,5% em TAE 1 X) e coloração do gel com brometo de etídio. Produtos de PCR correspondentes ao tamanho esperado foram selecionados para sequenciação comercial (CCMAR-UA1g), correspondendo a um mínimo de 30 clones por transformação.

Alguns dos produtos de PCR mais longos ou mais curtos do que o tamanho esperado, foram também selecionados para sequenciação. No entanto verificou-se que correspondiam a sequências de baixa complexidade, pelo que não foram considerados nas análises subsequentes.

2.5. Análise bioinformática

2.5.1. Tratamento e edição das sequências

As sequências obtidas foram visualizadas no editor de sequências BioEdit (Hall, 1999). As sequências foram cortadas pelos primers 27F e 534R, tendo sido criados ficheiros em formato fasta, representativos do microbioma de cada compartimento amostrado em cada indivíduo, num total de 26 ficheiros. Cada ficheiro de sequências foi sujeito a uma análise BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), na aplicação BLASTN 2.8.0 disponível em NCBI (<https://eee.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a base de dados *16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)* e excluindo organismos não cultivados. Os ficheiros obtidos de BLASTN foram importados para MEGAN versão 6.12.0 (Huson, 2018).

2.5.2. O programa computacional MEGAN

Este programa computacional é usado para calcular e explorar o conteúdo taxonómico de conjuntos de dados metagenómicos, nomeadamente de dados obtidos da sequenciação de microbiomas. É necessário um passo de pré-processamento, referido em 2.5.1., em que o conjunto de sequências de DNA obtidas (leituras) é comparado com uma base de dados de sequências conhecidas, usando BLASTN ou outra ferramenta de comparação. O programa MEGAN lê o alinhamento obtido de BLASTN (com 100 correspondências, ou *hits*, por leitura) para computar e explorar o conteúdo taxonómico do conjunto de dados em estudo, empregando a taxonomia de NCBI para sumarizar e

ordenar os resultados (Huson *et al.*, 2016). A taxonomia de NCBI fornece atualmente identificação para cerca de 25 000 Procariotas. As espécies individuais estão hierarquicamente agrupadas em clados, com os seguintes níveis reconhecidos taxonomicamente: reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie. MEGAN constrói o cladograma para um determinado microbioma com base no algoritmo LCA (*lowest common ancestor* ou menor ancestral comum), que atribui as leituras a unidades taxonômicas operacionais inferindo o menor ancestral comum para as principais correspondências do BLAST (Huson, 2018). Cada leitura é imputada a um táxon, de modo que o nível taxonômico atribuído reflete o grau de conservação da sequência. A identidade taxonômica, definida a um determinado nível da hierarquia NCBI é, portanto, feita com base na homologia com sequências conhecidas registrada no ficheiro de alinhamento BLASTN. O algoritmo LCA é usado em duas etapas sucessivas de classificação: a primeira para determinar o táxon a atribuir a uma determinada correspondência do BLASTN e a segunda para determinar que táxon atribuir à sequência em estudo. O programa implementa a seguinte aproximação para determinar o perfil de táxones para um determinado microbioma:

1-leitura dos alinhamentos contidos no ficheiro BLASTN

2-processamento do ficheiro para determinar os táxones representados no alinhamento que apresentam melhor correspondência, isto é, melhor *hit* ou o conjunto de melhores resultados, de acordo com a estatística *bit-score*.

3-para cada leitura r determina H , o conjunto de todos os táxones para os quais r apresentou melhor *hit*.

4-para cada leitura r encontra o nó menor, v , na taxonomia NCBI, que inclui H , o conjunto de táxones com melhor *hit*, e atribui a leitura r ao táxon representado por v .

O valor de *bit-score* é um indicador estatístico proeminente nos resultados de BLAST, mede a semelhança entre sequências, independentemente do comprimento da sequência em análise e do tamanho da base de dados, e é normalizado com base na pontuação (score) do alinhamento entre pares de sequências. Quanto maior o valor de *bit-score*, mais significativa é a correspondência encontrada para o alinhamento entre duas sequências. A medida *bit-score* fornece um indicador estatístico constante que não depende da base de dados ou do seu tamanho. Já o indicador *expected-value* (E) fornece informação sobre a probabilidade de a semelhança entre sequências ser puramente

devida ao acaso. Quanto mais baixo o valor de E , menos provável é que a semelhança encontrada entre duas sequências, para uma dada base de dados, seja devida ao acaso e, portanto, mais significativa se torna a correspondência. O valor de E é, no entanto, proporcionalmente afetado pelo tamanho da base de dados e assim, à medida que esta cresce, o valor de E para uma determinada correspondência também aumenta. Isto significa que embora a relação evolutiva genuína entre duas sequências se mantenha constante, à medida que a base de dados cresce ou quando outras bases de dados são consultadas, o grau de significância da correspondência encontrada vai variar, ao ponto de homologias anteriormente detetadas poderem ser desacreditadas. Neste contexto o indicador *bit-score* é uma alternativa mais robusta ao valor E .

MEGAN fornece o valor de *bit-score* limite, tendo em conta o tamanho das sequências alinhadas, que pode ser modificado pelo operador. Abaixo daquele limite qualquer correspondência é descartada da análise. O programa permite também estabelecer um segundo limite, para descartar *hits* cujo *bit-score* esteja abaixo duma determinada percentagem do melhor *hit*. Tipicamente este valor é estabelecido nos 10%. Finalmente um terceiro limite é usado para filtrar somente os táxones que estejam representados por um número mínimo de leituras ou percentagem mínima de todas as leituras atribuídas. Por defeito o programa requer que sejam atribuídas a um táxon pelo menos 0,1% de todas as leituras, para considerar esse táxon como presente no microbioma. Todas as leituras que estejam inicialmente atribuídas a um táxon naquelas condições são movidas para níveis taxonómicos superiores até ser atingido um nó que tenha leituras suficientes. Para cada nó do cladograma o programa fornece indicação do número de leituras atribuídas (*assigned*) e de leituras resumidas (*summarized*). As leituras atribuídas correspondem a sequências cuja atribuição taxonómica só é possível até ao nível taxonómico desse nó, enquanto que as leituras resumidas correspondem a sequências cuja atribuição taxonómica pode ser detalhada a níveis taxonómicos inferiores.

Para a análise de sequências do gene 16S do rRNA MEGAN pode utilizar a funcionalidade “16S Percent Identity Filter”, que permite a atribuição das leituras a um nível taxonómico específico. Quando aquela função é ativada, a percentagem de identidade duma determinada correspondência tem de exceder o respetivo valor limite para que seja atribuída a um determinado nível taxonómico: espécie 99%, género 97%, família 95%, ordem 90%, Classe 85% e Filo 80%.

Para além da estimativa da composição taxonómica do microbioma numa amostra, MEGAN permite o cálculo de índices de diversidade, bem como a comparação estatística entre conjuntos de amostras. A funcionalidade “Cluster analysis viewer” permite computar uma matriz de distâncias para um conjunto de amostras, baseada nos respetivos perfis taxonómicos. As distâncias calculadas podem ser graficadas sob a forma de PCoA (análise de coordenadas principais), agrupamento hierárquico do tipo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), árvore não enraizada do tipo NJ (Neighbor-Joining) ou tipo network (Neighbor-set).

2.5.3. Identificação taxonómica nas amostras e índices de diversidade

Para a identificação taxonómica do microbioma de cada compartimento em estudo, as análises feitas com MEGAN incluíram, num primeiro passo, a estimativa do conteúdo taxonómico (perfil de táxones) para cada compartimento amostrado de cada indivíduo (diversidade alfa), bem como as respetivas curvas de rarefação (variação do número de táxones em função do número de sequências) de modo a avaliar a representatividade da riqueza em táxones descrita pelo número de sequências obtido. Índices de diversidade de Shannon-Weaver e de Simpson recíproco foram também calculados para cada compartimento amostrado de cada indivíduo. O índice de Shannon-Weaver (H') é um índice de heterogeneidade, que dá uma medida da diversidade combinando a riqueza em espécies e as suas abundâncias relativas (equabilidade). É calculado pela seguinte fórmula:

$$H' = -\sum_{i=1}^S (p_i \log_2 p_i)$$

em que H' = índice de diversidade de Shannon-Wiener; S é o número total de espécies; $p_i = n_i / N$; n_i corresponde ao número de indivíduos da espécie i presente na amostra; N representa o número total de organismos na amostra. Este índice é sensível à presença de espécies raras na amostra e quanto maior o valor deste índice maior será a diversidade.

O índice de Simpson recíproco (D') quantifica a diversidade tendo em conta também a riqueza em espécies e a equabilidade. É calculado pela seguinte fórmula:

$$D' = 1/D$$

$$D = \frac{\sum n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

em que N= número total de organismos de todas as espécies encontradas e n= número de indivíduos de uma dada espécie. Quanto maior o valor encontrado maior é a diversidade. O valor menor possível para este índice é 1 e ocorre quando a comunidade contém somente 1 espécie. O valor máximo ocorre quando existe equabilidade perfeita e será igual ao número de espécies. Este índice dá mais peso às espécies mais abundantes na amostra, pelo que é também designado por índice de dominância.

2.5.4. Determinação do microbioma em cada compartimento amostrado

Seguidamente foi feita a análise comparativa das amostras de cada compartimento (intra AA e intra DA), após normalização dos dados para compensar diferentes tamanhos de amostras (diferentes números de sequências obtidas de cada indivíduo para o mesmo compartimento) e considerar a dispersão específica das amostras (Jovel *et al.*, 2016). Com base nesta análise (diversidade beta) foi feita a estimativa do perfil taxonómico do microbioma total (*total biome*), microbioma fundamental (*core biome*) e microbioma raro (*rare biome*) para cada compartimento, usando a informação obtida dos 3 animais amostrados (AA ou DA). Para a determinação do microbioma total MEGAN considera todos os táxones identificados no total das amostras do mesmo compartimento. Para o microbioma fundamental (definido como a comunidade mínima de microrganismos que é essencial ao funcionamento do ecossistema), quando possível determinar, foram considerados os táxones presentes em 100% das amostras, com uma frequência de pelo menos 25% no caso dos compartimentos HP, DIVERT, E e I, de pelo menos 10% no caso de TC e de pelo menos 5% no caso de HL. Para o microbioma raro foram considerados os táxones presentes em pelo menos 50% das amostras e com uma frequência de até 1%.

2.5.5. Comparação entre AA e DA

Foi feita a comparação da diversidade bacteriana em animais alimentados (DA) e não alimentados (AA), tendo por base os valores de frequência de cada táxon nas amostras HL e I, bem como os índices de diversidade de Shannon e de Simpson recíproco, obtidos com MEGAN. Este programa foi também utilizado para calcular uma matriz de distâncias entre pares de amostras, a partir dos perfis taxonómicos de cada amostra.

Esta matriz foi calculada com base no índice ecológico de Bray-Curtis e utilizada para a análise de coordenadas principais (PCoA). PCoA é uma ferramenta de estatística multivariada utilizada para analisar diferenças entre comunidades microbianas com base numa matriz de distâncias (Ramete, 2007). Foi aqui aplicada com a finalidade de fornecer dados que pudessem orientar numa análise detalhada e informativa para os principais táxones responsáveis pelas diferenças existentes em cada grupo de amostras (AA vs. DA).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Caracterização dos animais amostrados

Neste trabalho foram usados um total de seis animais. Foram amostrados 3 animais (indivíduos 1, 2 e 3) antes do período de alimentação (AA) e três animais (indivíduos 4, 5 e 6) depois do período de alimentação (DA). A caracterização dos indivíduos amostrados está sumarizada na tabela 3.1. Em cada animal foi extraída hemolinfa, e tecidos dos órgãos do trato digestivo: esófago (TC), hepatopâncreas (HP), divertículos do hepatopâncreas (DIVERT), estômago (E), ceco (E) e intestino (I).

Tabela 3.1. Caracterização dos indivíduos usados neste estudo.

| Indivíduo | Peso | Sexo | Estado de maturação |
|--------------------|-------------|-------------|----------------------------|
| Indivíduo 1 | 207 | Macho | Completa |
| Indivíduo 2 | 105,3 | Macho | Incompleta |
| Indivíduo 3 | 157 | Macho | Completa |
| Indivíduo 4 | 257,5 | Fêmea | Completa |
| Indivíduo 5 | 266,6 | Fêmea | Completa |
| Indivíduo 6 | 143,7 | Fêmea | Incompleta |

3.2. Sequências obtidas e preparação dos ficheiros para MEGAN

Para todas as amostras foi extraído DNA, seguido da amplificação por PCR. No caso da amostra DIVERT do indivíduo 1 não foi possível obter amplificação por PCR, pelo que esta amostra não foi incluída no estudo. No caso dos indivíduos DA o estudo centrou-se nas amostras HL e I. Na tabela 3.2 está indicado o número de sequências obtidas para cada compartimento amostrado para indivíduos AA e DA. Estes números referem-se às sequências obtidas de fragmentos amplificados com o tamanho esperado. Embora neste trabalho tenham também sido sequenciados fragmentos com tamanho maior ou menor do que o esperado, foi verificado, por inspeção visual com o programa BioEdit e comprovado ao fazer a análise BLAST, que as sequências correspondentes eram de baixa complexidade (*low complexity sequences*, isto é, sequências com repetições sucessivas de nucleótidos, exemplo: AAATAAAAAAAAAATAAAAAAT). Este tipo de sequências conduz frequentemente a falsas identificações pelo que são retiradas da análise pelo filtro do BLAST.

Tabela 3.2. Número de sequências (por indivíduo e total dos três indivíduos) obtidas para cada compartimento, para animais amostrados antes da alimentação (AA) e depois da alimentação (DA). HL-hemolinfa; TC- esôfago; HP-hepatopâncreas; DIVERT-divertículos do hepatopâncreas; E-estômago; C- ceco; I-intestino.

| Amostra | Nº de sequências por indivíduo | Nº de sequências por compartimento* |
|--------------------|---------------------------------------|--|
| HL (AA) | 58; 45; 31 | 134 |
| HL (DA) | 38; 35; 31 | 104 |
| TC (AA) | 36; 32; 48 | 116 |
| HP (AA) | 32; 32; 31 | 95 |
| DIVERT (AA) | 0; 32; 32 | 64 |
| E (AA) | 30; 31; 32 | 93 |
| C (AA) | 31; 31; 31 | 93 |
| I (AA) | 31; 32; 32 | 95 |
| I (DA) | 31; 48; 32 | 111 |
| Total | | 906 |

*Total dos indivíduos

3.3 Apresentação dos resultados com base nas análises bioinformáticas feitas em MEGAN

Tal como já referido na secção 2.5 de materiais e métodos, uma vez obtidos os ficheiros BLAST, todas as análises bioinformáticas foram feitas no programa MEGAN. Para cada compartimento amostrado de cada indivíduo, o nível taxonómico mais baixo usado na construção do cladograma foi o de Família. Verificou-se que este era o nível taxonómico que permitia a atribuição de identidade a todas as leituras obtidas. Só parte das leituras obtidas para cada compartimento continha informação adequada para ser atribuída a níveis taxonómicos mais baixos. Inicialmente para cada amostra (21 amostras de AA e 6 amostras de DA) foi obtida a composição taxonómica do microbioma sob a forma de gráfico de barras representando o número de leituras (%) obtido para cada táxon. Foram determinadas as respetivas curvas de rarefação e calculados os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') e de Simpson recíproco

(D'). A variabilidade entre indivíduos foi analisada, para cada compartimento. Seguidamente, para os compartimentos em análise nos 3 indivíduos AA (HL, TC, HP, DIVERT, E, C e I), e para os dois compartimentos em análise nos 3 indivíduos DA (HL e I) foi feita a normalização do número de sequências e foi determinado i) o microbioma total, ii) o microbioma fundamental, iii) o microbioma raro e iv) os respectivos índices de Shannon-Weaver (H') e de Simpson recíproco (D').

Os resultados de abundância relativa dos táxones encontrados em HL e em I para indivíduos AA e DA foram estatisticamente comparados.

Foi construída uma matriz de distâncias de Bray-Curtis entre as amostras HL obtidas de AA e DA e entre as amostras I obtidas de AA e DA. Aquelas matrizes foram visualizadas através de PCoA.

3.4. Diversidade e composição taxonômica do microbioma da hemolinfa e de compartimentos do trato digestivo em cada indivíduo

Na maior parte dos estudos realizados com a microbiota em animais aquáticos com interesse na aquicultura, são usadas amostras compostas, isto é, amostras de um determinado tecido ou órgão contribuídas por diferentes animais. Segundo Ringo *et al.*, (2016) este procedimento não permite avaliar o enviesamento nos resultados causado por variações na microbiota ao nível individual. Esta estratégia, conquanto forneça um panorama geral dum determinado microbioma, não permite determinar a variabilidade entre indivíduos, nem a contribuição que cada indivíduo dá para a frequência estimada para cada táxon.

Para avaliar a diversidade e frequência dos táxones bacterianos entre os indivíduos, neste trabalho as amostras foram analisadas individualmente. Assim, foram analisadas as comunidades bacterianas das amostras de hemolinfa e dos compartimentos do trato digestivo de três indivíduos amostrados antes da alimentação (AA) e as amostras de hemolinfa e do intestino de três indivíduos amostrados depois da alimentação (DA).

3.4.1. Indivíduos AA

A comparação dos perfis taxonômicos dos microbiomas dos 3 indivíduos AA (fig. 3.1 A, C e E) mostra diferenças claras entre os indivíduos, sendo o indivíduo 1 o que apresenta maior diversidade taxonômica em todos os compartimentos, com exceção do ceco.

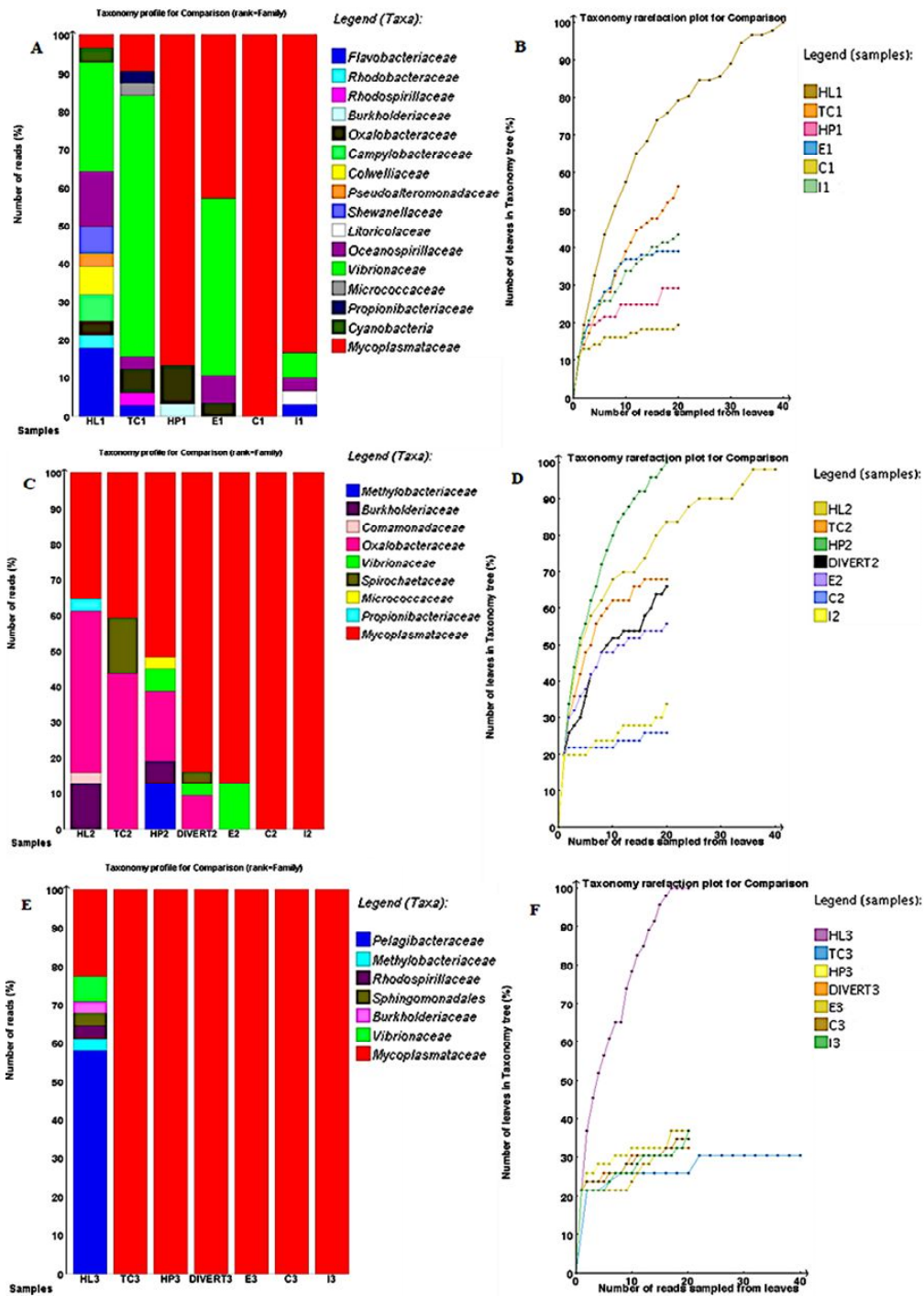


Figura 3.1: Comparação do perfil taxonômico (composição e frequência de táxones) do microbioma no indivíduo 1 (A), indivíduo 2 (C) e indivíduo 3 (E) e curva de rarefação do indivíduo 1 (B), indivíduo 2 (D), indivíduo 3 (F). amostrados antes da alimentação (AA). Os perfis taxonômicos mostram os táxones encontrados, ao nível da família, e a percentagem de sequências resumidas em cada táxon presente em cada amostra. As curvas de rarefação mostram a variação do número de táxones em função do número de sequências.

O compartimento com maior diversidade nos indivíduos 1 e 3 é o da hemolinfa, enquanto que no indivíduo 2 é o hepatopâncreas. Nas amostras do indivíduo 1 foram encontradas especificamente as seguintes famílias: *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Campylobacteraceae*, *Colwelliaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Shewanellaceae*, *Litoricolaceae* e *Oceanospirillaceae*. No indivíduo 2 aparecem em exclusivo as famílias *Comamonadaceae* e *Spirochaetaceae*. Por fim, o indivíduo 3 é o único em que se deteta a presença da família *Pelagibacteraceae* (encontrada na hemolinfa). Apesar dessas diferenças, os resultados mostram a presença em todos os indivíduos da família *Mycoplasmataceae*, quer nas amostras HL quer nas amostras dos compartimentos do trato digestivo.

A análise das curvas de rarefação (fig. 3.1 B, D e F) mostra que, sobretudo no caso da hemolinfa (HL1, HL2 e HL3) o número de sequências obtidas para cada indivíduo poderá não ter sido suficiente para descrever totalmente a diversidade de táxones presentes nas amostras. No entanto, verifica-se que as curvas de rarefação determinadas estão em inflexão, em todas as amostras, a partir do valor de 20% de táxones detetados, mostrando que há repetição da deteção de determinados táxones em cada amostra. Este efeito é mais marcado nas curvas de rarefação do indivíduo 3, em que se verifica a presença unicamente de *Mycoplasmataceae* em todos os compartimentos do trato digestivo.

Os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') de Simpson recíproco (D') (tabela 3.3) dão outra medida da diversidade entre os 3 indivíduos, reforçando a grande diversidade existente de indivíduo para indivíduo para um mesmo compartimento, com base no número de famílias detetadas. Na tabela 3.3 estão indicados a negrito os valores de diversidade mais elevados encontrados em cada indivíduo. Note-se que para o indivíduo 1, à exceção do ceco, em todos os compartimentos do trato digestivo e na hemolinfa foram encontradas mais do que uma família, enquanto que para o indivíduo 3 só a hemolinfa apresentou diversidade de táxones.

Tabela 3.3. Comparação da diversidade entre os microbiomas dos indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). HL: hemolinfa; TC: esôfago; HP: hepatopâncreas; DIVERT: divertículo; E: estomago; C: ceco; I: intestino; H' - índice de Shannon-Weaver; D' - índice de Simpson recíproco; n/a: não aplicável

| Amostra | Indivíduo 1 | | | | Indivíduo 2 | | | | Indivíduo 3 | | | |
|---------|----------------|----------------|-----------------------|--------------|----------------|----------------|-----------------------|--------------|----------------|----------------|-----------------------|--------------|
| | Nº de leituras | Nº de famílias | Índice de diversidade | | Nº de leituras | Nº de famílias | Índice de diversidade | | Nº de leituras | Nº de famílias | Índice de diversidade | |
| | | | H' | D' | | | H' | D' | | | H' | D' |
| HL | 58 | 10 | 2.772 | 5.000 | 45 | 5 | 1.645 | 2.674 | 31 | 6 | 1.683 | 2.368 |
| TC | 36 | 8 | 1.588 | 1.867 | 32 | 3 | 1.468 | 2.626 | 48 | 1 | 0.000 | 1.000 |
| HP | 32 | 3 | 0.645 | 1.290 | 32 | 6 | 2.002 | 3.032 | 31 | 1 | 0.000 | 1.000 |
| DIVERT | n/a | n/a | n/a | n/a | 32 | 4 | 0.839 | 1.384 | 32 | 1 | 0.000 | 1.000 |
| E | 30 | 4 | 1.481 | 2.465 | 31 | 2 | 0.555 | 1.290 | 32 | 1 | 0.000 | 1.000 |
| C | 31 | 1 | 0.000 | 1.000 | 31 | 1 | 0.000 | 1.000 | 31 | 1 | 0.000 | 1.000 |
| I | 31 | 5 | 0.947 | 1.407 | 32 | 1 | 0.000 | 1.000 | 32 | 1 | 0.000 | 1.000 |

3.4.2. Indivíduos DA

O resultado do perfil taxonômico nas amostras da hemolinfa (fig. 3.2A) em animais amostrados depois da alimentação (DA) indicou que *Mycoplasmataceae* foi encontrada nos três indivíduos, sendo a família com maior percentagem de seqüências resumidas. As famílias *Methylobacteriaceae*, *Micrococcaceae* e *Enterobacteriaceae* foram encontradas na amostra do individuo 4 (HL4); *Rhodobacteraceae*, *Alcanivoraceae* e *Moraxellaceae* nas amostras do individuo 5 (HL5) e as famílias *Vibrionaceae*, *Burkholderiaceae* e *Oxalobacteraceae* foram comuns nas amostras dos indivíduos 4 e 5 (HL4 e HL5).

A análise das curvas de rarefação (fig. 3.2B) mostra que, no caso dos indivíduos 4 e 5 (HL4 e HL5), o número de seqüências obtidas para cada indivíduo poderá não ter sido suficiente para descrever totalmente a diversidade de táxones presentes nas amostras.

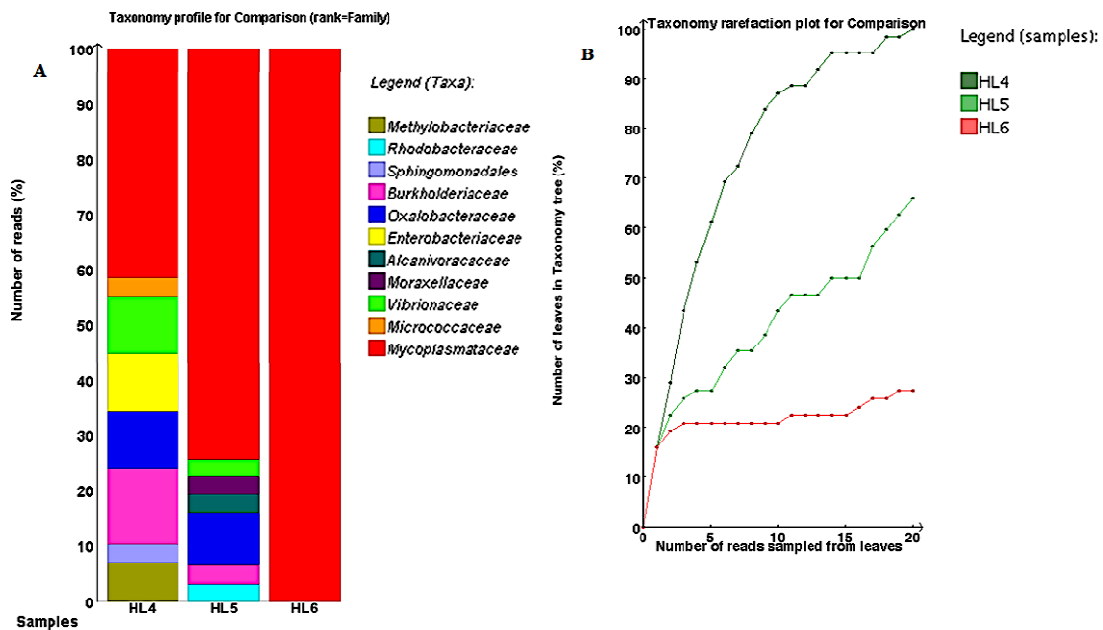


Figura 3.2. Comparação do perfil taxonômico (A, composição e frequência de táxones) do microbioma da hemolinfa no individuo 4 (HL4), individuo 5 (HL5) e individuo 6 (HL6) e respectivas curvas de rarefação (B). Os perfis taxonômicos mostram os táxones encontrados, ao nível da família, e a percentagem de seqüências resumidas em cada táxon presente em cada amostra. As curvas de rarefação mostram a variação do número de táxones em função do número de seqüências.

A análise do perfil taxonômico nas amostras do intestino (fig. 3.3A) dos animais amostrados depois da alimentação (DA) indicou a presença de *Mycoplasmataceae*, nos

três indivíduos (I4, I5 e I6). *Cyanobacteria* esteve presente nos indivíduos 5 e 6 (I5 e I6) e *Spirochaetaceae* foi encontrada somente no indivíduo 4 (I4).

A análise das curvas de rarefação mostrou estabilização no caso do indivíduo 5 (I5) a cerca de 80% de sequências obtidas, enquanto que, no caso dos outros dois indivíduos (I4 e I6), o número de sequências obtidas poderá não ter sido suficiente para descrever totalmente a diversidade de táxones presentes nas amostras.

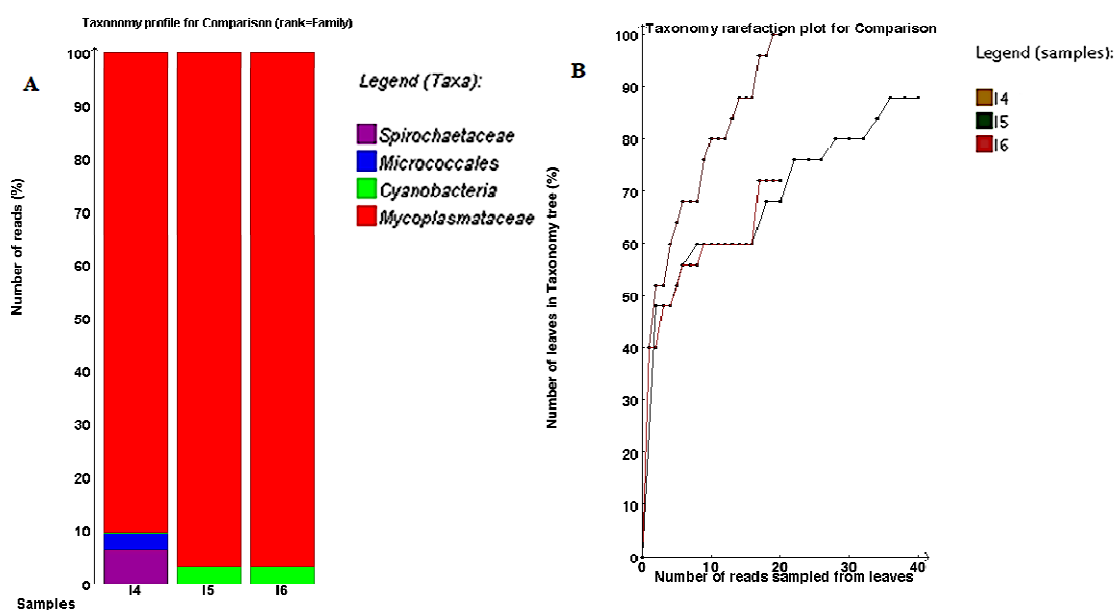


Figura 3.3. Comparação do perfil taxonômico (A, composição e frequência de táxones) do microbioma do intestino no indivíduo 4 (I4), indivíduo 5 (I5) e indivíduo 6 (I6) e respectivas curvas de rarefação (B). Os perfis taxonômicos mostram os táxones encontrados, ao nível da família, e a porcentagem de sequências resumidas em cada táxon presente em cada amostra. As curvas de rarefação mostram a variação do número de táxones em função do número de sequências.

Os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H') de Simpson recíproco (D') (tabela 3.4) calculados com base no número de famílias representadas, reforçam a grande diversidade existente de indivíduo para indivíduo quer para HL quer para I.

Tabela 3.4. Comparação da diversidade entre as amostras dos indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). **HL**: hemolinfa; **I**: intestino; H' : índice de diversidade de Shannon-Weaver; D' : índice de Simpson recíproco.

| Amostra | Indivíduo 4 | | | | Indivíduo 5 | | | | Indivíduo 6 | | | |
|-----------|----------------|----------------|-----------------------|-------|----------------|----------------|-----------------------|-------|----------------|----------------|-----------------------|-------|
| | Nº de leituras | Nº de famílias | Índice de diversidade | | Nº de leituras | Nº de famílias | Índice de diversidade | | Nº de leituras | Nº de famílias | Índice de diversidade | |
| | | | H' | D' | | | H' | D' | | | H' | D' |
| HL | 38 | 7 | 2.394 | 4.070 | 35 | 7 | 1.353 | 1.675 | 31 | 1 | 0.000 | 1.000 |
| I | 31 | 2 | 0.353 | 1.142 | 48 | 1 | 0.000 | 1.000 | 32 | 1 | 0.000 | 1.000 |

3.5 Microbioma total, microbioma fundamental e microbioma raro da hemolinfa e de compartimentos do trato digestivo

Para os compartimentos em análise nos 3 indivíduos AA (HL, TC, HP, DIVERT, E, C e I), e para os dois compartimentos em análise nos 3 indivíduos DA (HL e I) foi feita a normalização do número de sequências e foi determinado i) o microbioma total, ii) o microbioma fundamental, iii) o microbioma raro e iv) os respectivos índices de Shannon-Weaver (H') e de Simpson recíproco (D').

O microbioma total foi calculado considerando todos os táxones identificados no total das amostras do mesmo compartimento. Para o microbioma fundamental foram considerados os táxones presentes em 100% das amostras, com uma frequência de pelo menos 25% no caso dos compartimentos HP, DIVERT, E e I. Devido à grande diversidade de táxones presentes no indivíduo 1 nos compartimentos TC e HL, para o cálculo dos respectivos microbiomas fundamentais foram consideradas os táxones presentes em 100% das amostras com pelo menos 10% das sequências resumidas no caso de TC e de pelo menos 5% das sequências resumidas no caso de HL. Para o microbioma raro foram considerados os táxones presentes em pelo menos 50% das amostras e com uma frequência de até 1%, em qualquer dos compartimentos.

3.5.1. Caracterização do microbioma associado à hemolinfa em animais AA

A determinação do microbioma total (fig. 3.4) foi feita com base em 102 leituras normalizadas, atribuídas a 18 famílias. Proteobacteria foi o filo com maior representação, com 13 famílias e um total de 90 leituras: *Pelagibacteraceae*, *Methylobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Colwelliaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Shewanellaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Campylobacteraceae* e *Vibrionaceae*.

O microbioma fundamental da hemolinfa foi essencialmente constituído por *Mycoplasmataceae*, com 16 leituras atribuídas a esta família e 1 leitura atribuída a ordem *Burkholderiales* (fig. 3.5). O microbioma raro (fig. 3.6) foi constituído por 85 leituras, com todos os grupos taxonómicos presentes na microbiota total. A inspeção ao nível de espécie das 3 leituras atribuídas a *Mycoplasmataceae* no microbioma raro mostrou que pertencem a uma espécie de micoplasma diferente das consideradas no microbioma fundamental.

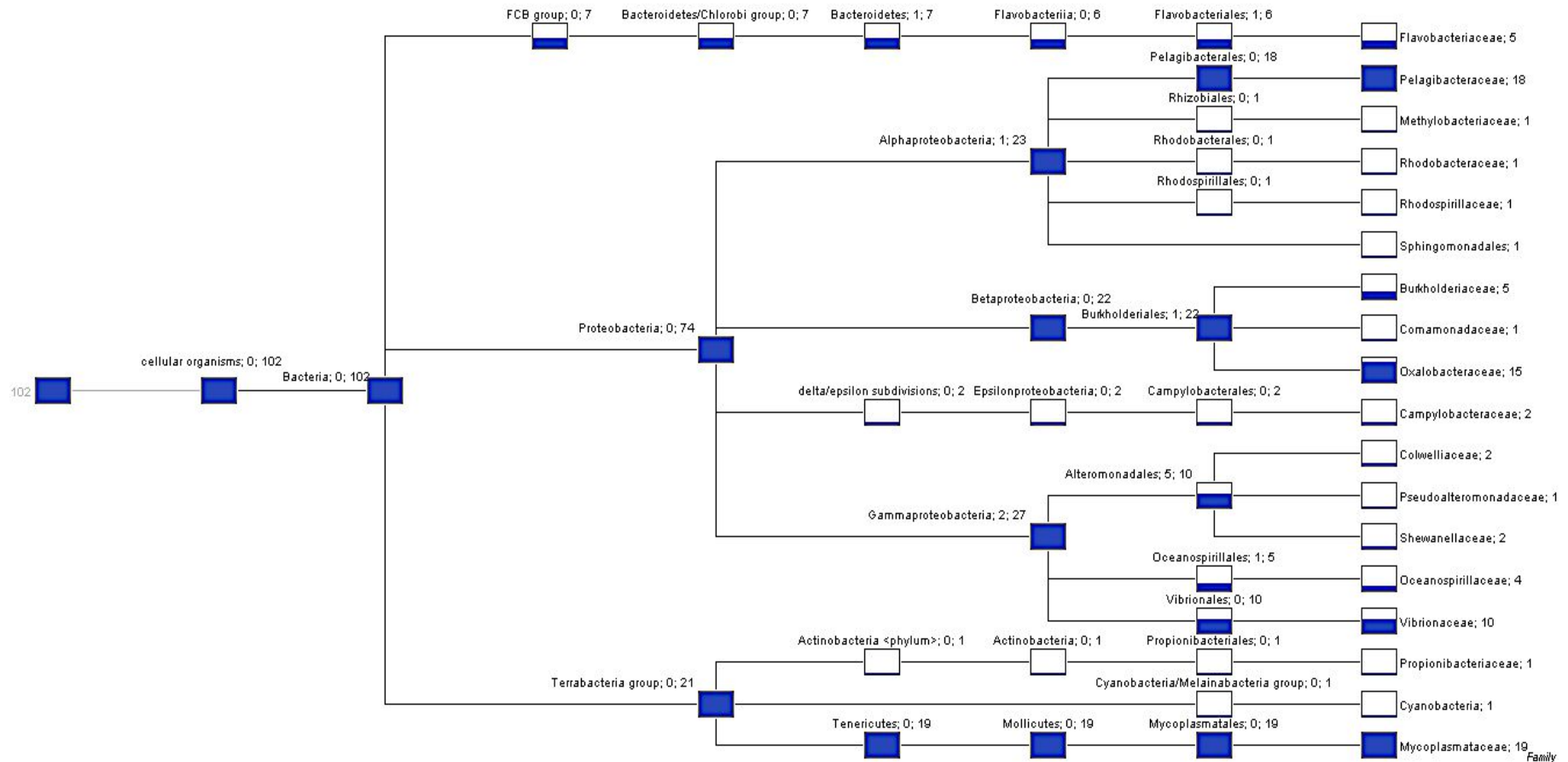


Figura 3.4: Diversidade taxonómica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonómicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonómica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

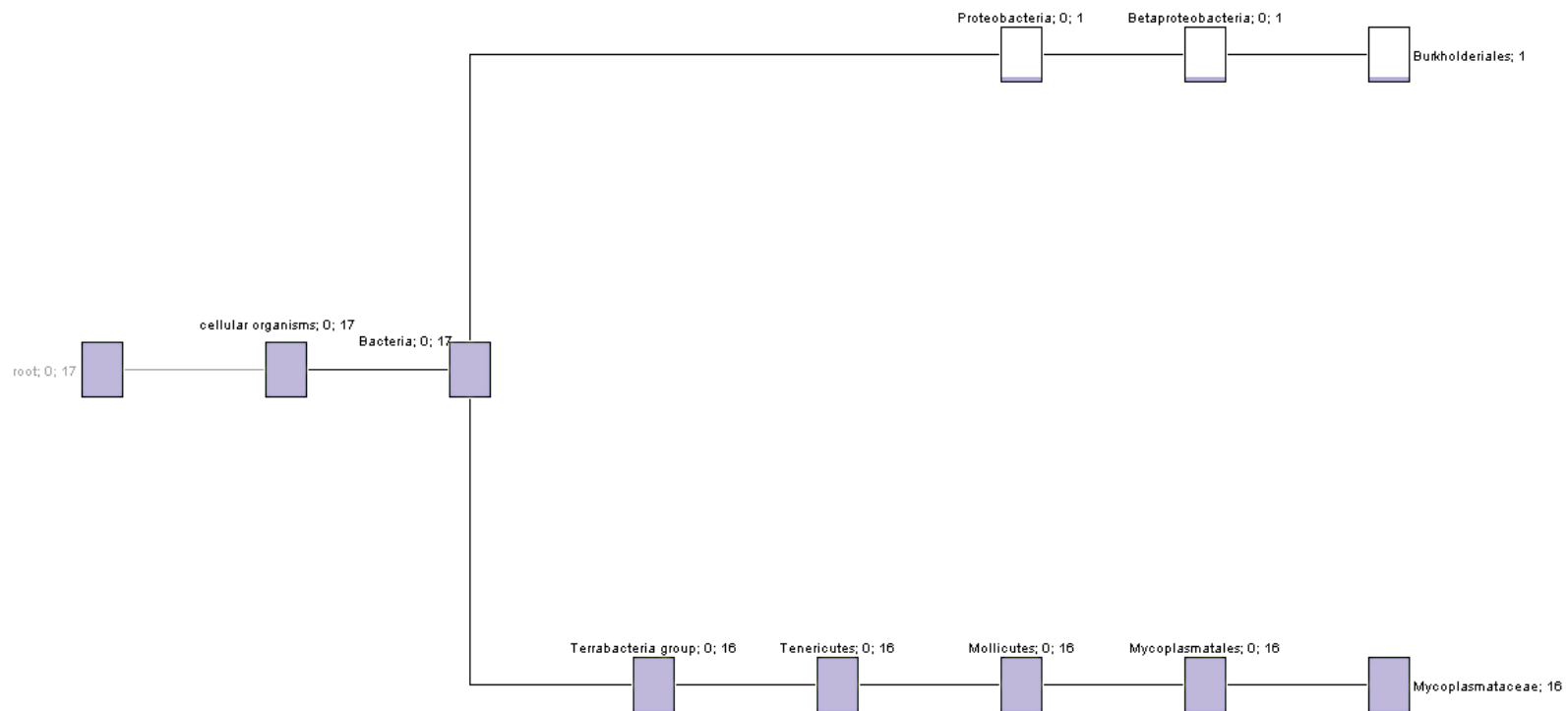


Figura 3.5: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas das amostras da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 5%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

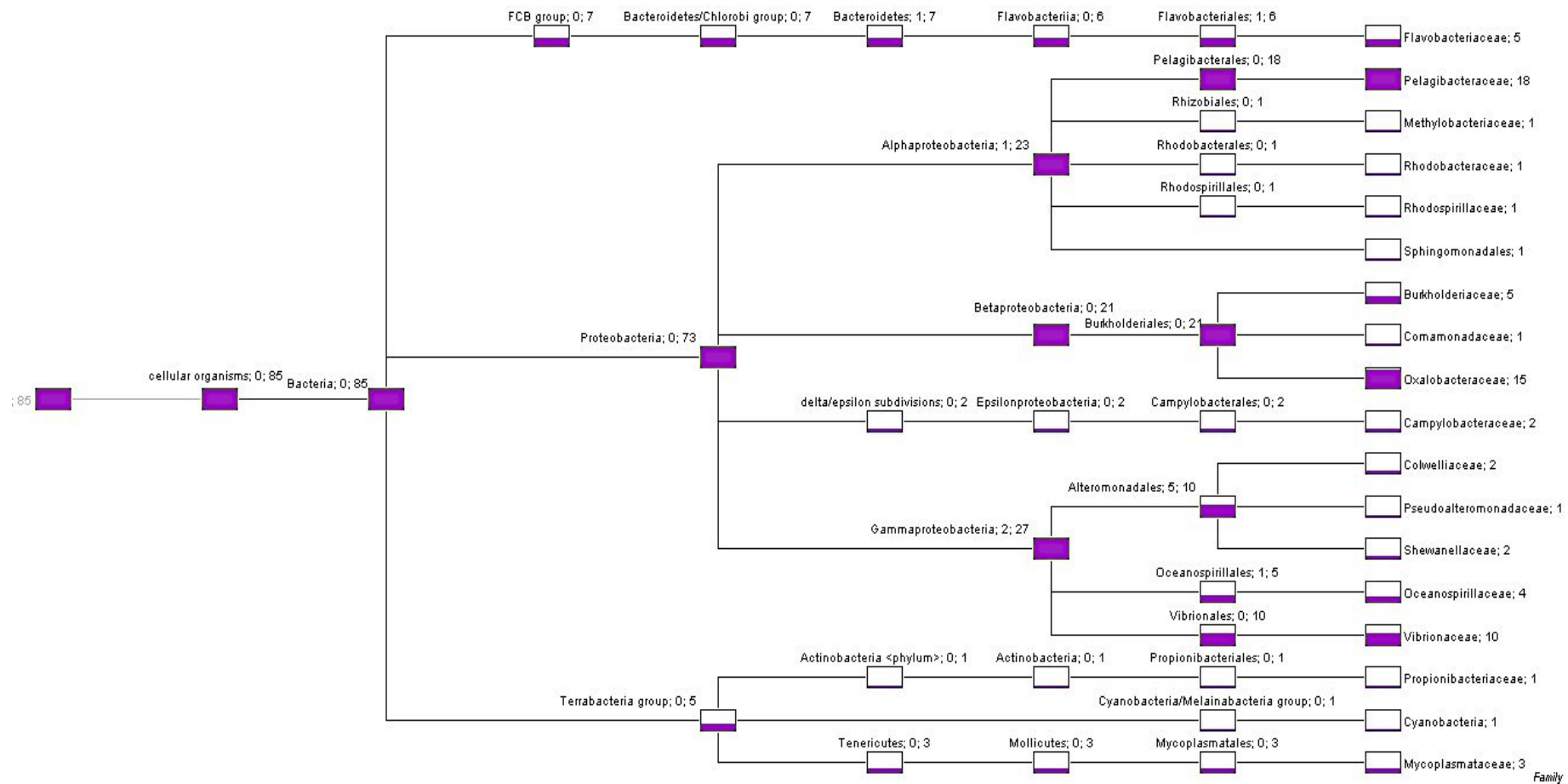


Figura 3.6: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

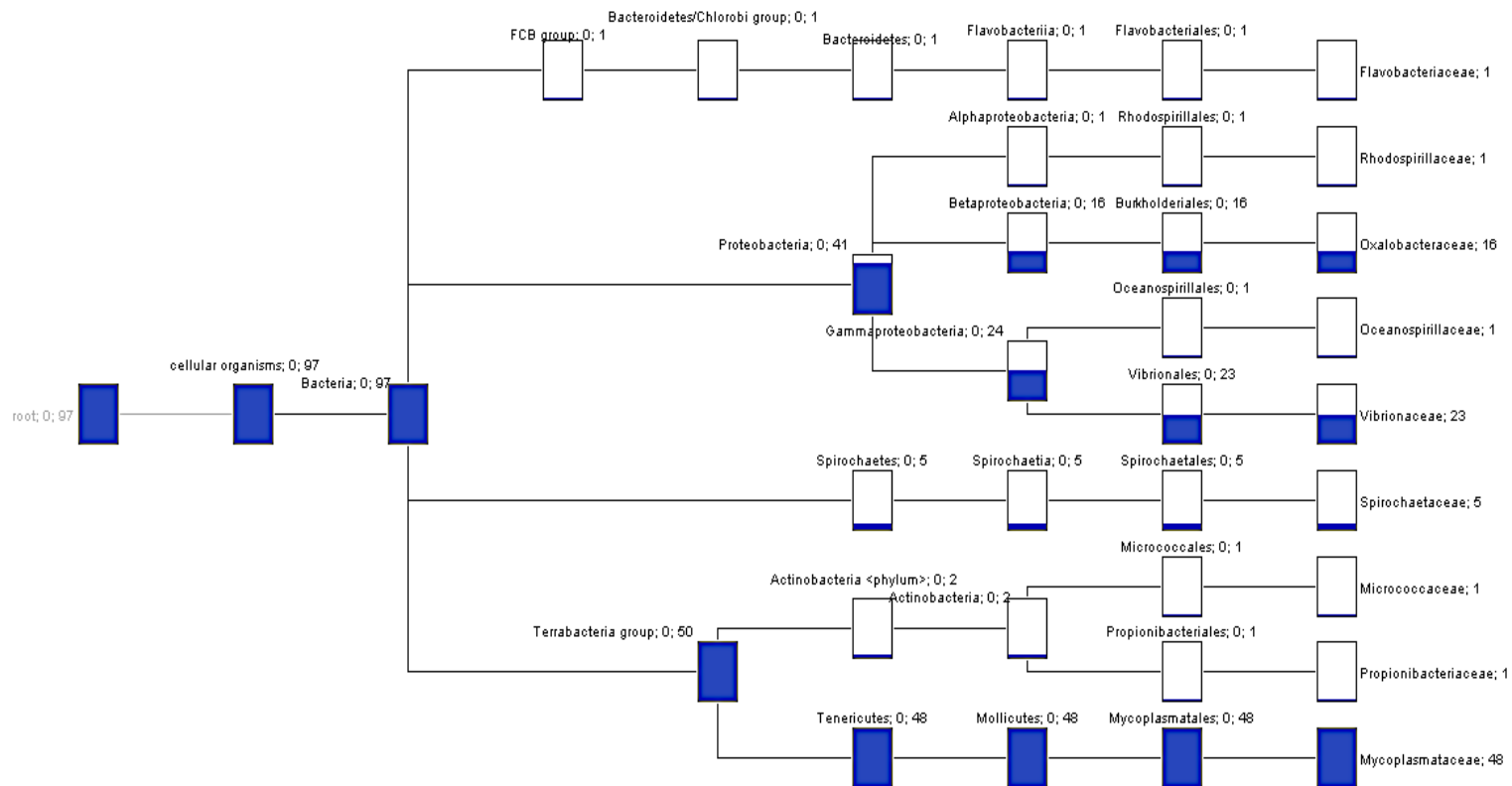
Os valores dos índices de diversidade de Shannon-Weaver e de Simpson recíproco para o microbioma total e microbioma raro são mostrados nas tabelas 3.5 e 3.6. Os valores daqueles índices para o microbioma fundamental na hemolinfa foram de 0 e 1 respectivamente.

3.5.2. Caracterização do microbioma associada ao esôfago em AA

A composição do microbioma total (fig. 3.7) foi determinada com base em 97 leituras normalizadas, atribuídas a 9 famílias. A família mais representada foi *Mycoplasmataceae*, com 48 leituras. O grupo Proteobacteria foi representado por 4 famílias e um total de 41 leituras: *Oceanospirillaceae*, *Vibrionaceae*, *Oxalobacteraceae* e *Rhodospirillaceae*. As restantes leituras foram atribuídas a 4 famílias, *Flavobacteriaceae* (Bacteroidetes), *Spirochaetaceae* (Spirochaetia), *Micrococcaceae* e *Propionibacteriaceae* (Actinobacteria).

O microbioma fundamental (fig 3.8) foi constituído exclusivamente por *Mycoplasmataceae*.

O microbioma raro (fig. 3.9) foi constituído por 48 leituras atribuídas a 8 famílias, com total com ausência de *Mycoplasmataceae*.



Family

Figura 3.7: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do esôfago (TC) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

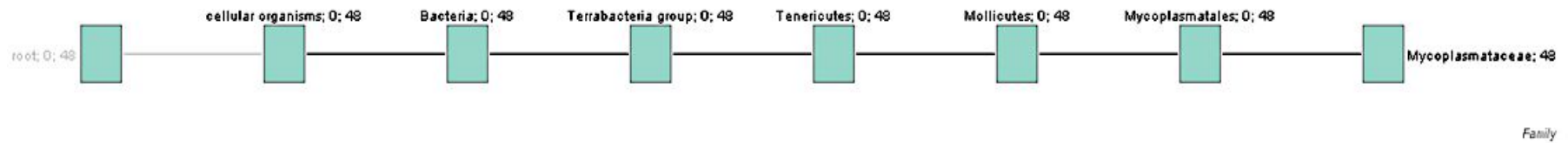
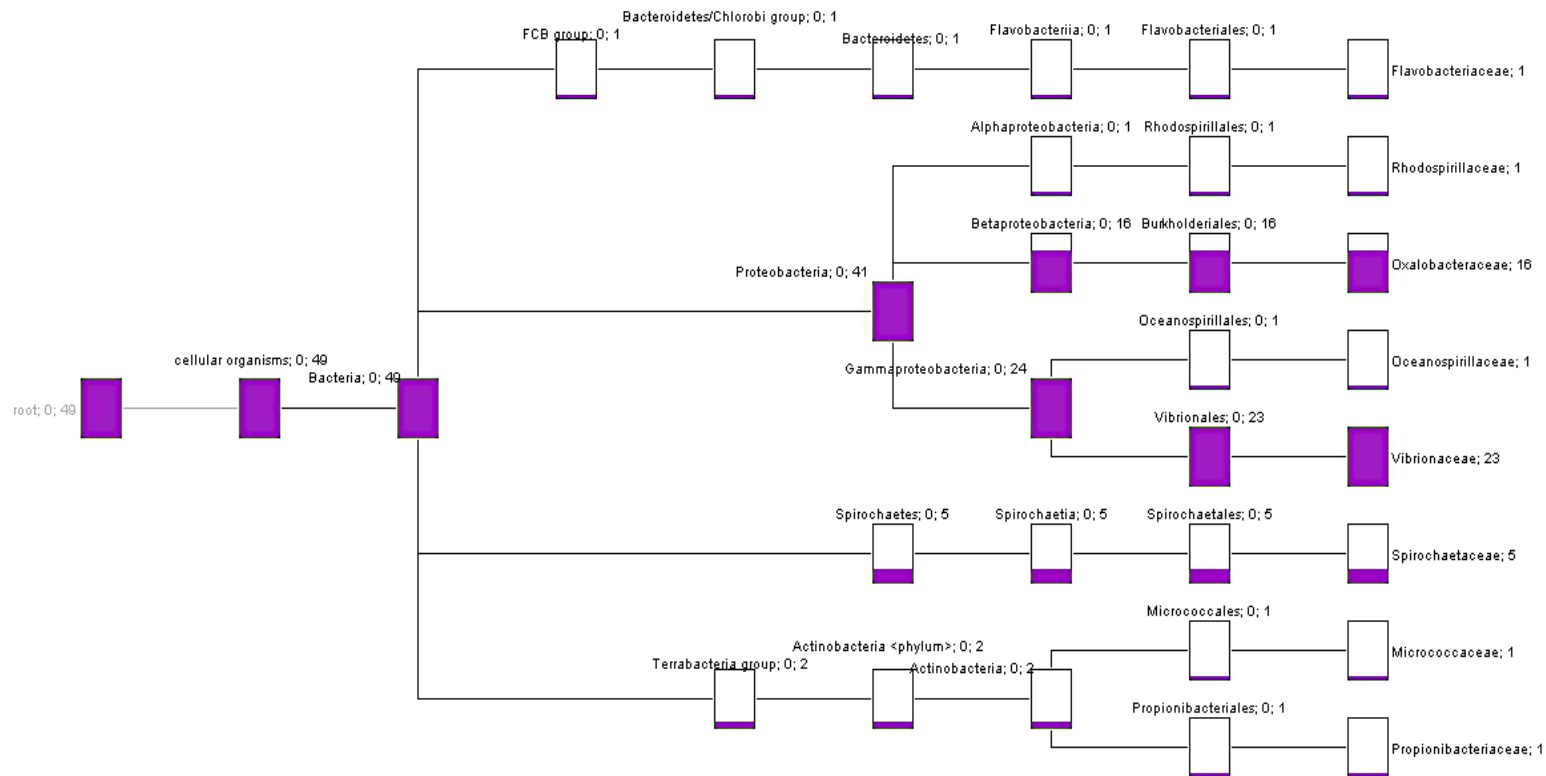


Figura 3.8: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do esôfago (TC) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 10%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.



Family

Figura 3.9: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do esôfago (TC) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (Lowest Common Ancestor) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

3.5.3. Caracterização do microbioma associada ao hepatopâncreas em animais AA

No hepatopâncreas, o microbioma total (fig. 3.10) foi determinado com base em 93 leituras normalizadas, distribuídas por 6 famílias. O maior número de leituras foi atribuído à família *Mycoplasmataceae*. Proteobacteria foi representada pelas famílias *Methylobacteriaceae*, *Burkholderiaceae*, *Oxalobacteraceae* e *Vibrionaceae*, num total de 18 leituras.

O microbioma fundamental foi constituído exclusivamente por *Mycoplasmataceae* (fig. 3.11).

A análise do microbioma raro, mostrou que as 19 leituras foram atribuídas a 5 famílias, as mesmas do microbioma total com exclusão de *Mycoplasmataceae* (fig. 3.12).

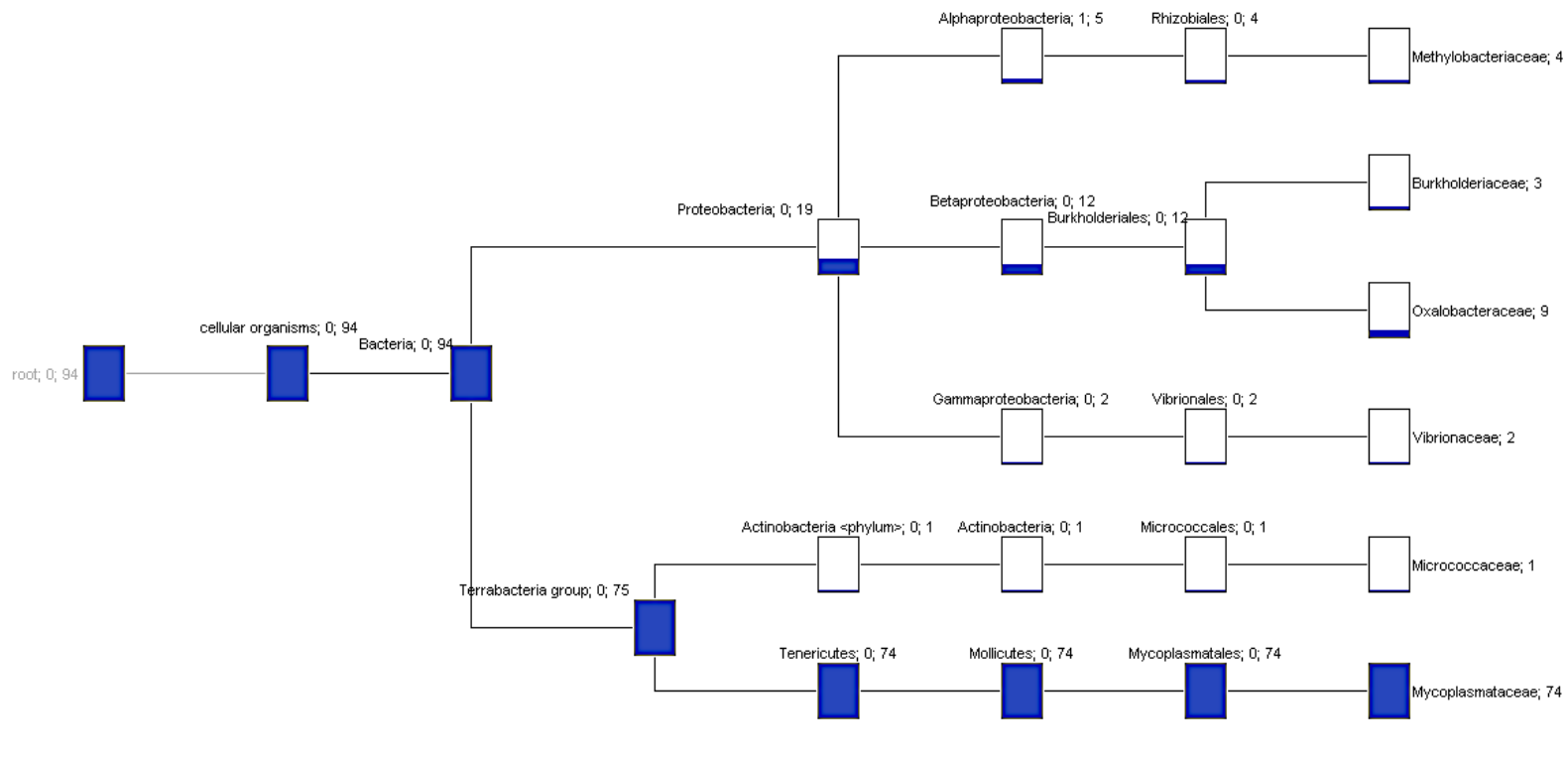


Figura 3.10: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do hepatopâncreas (HP) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

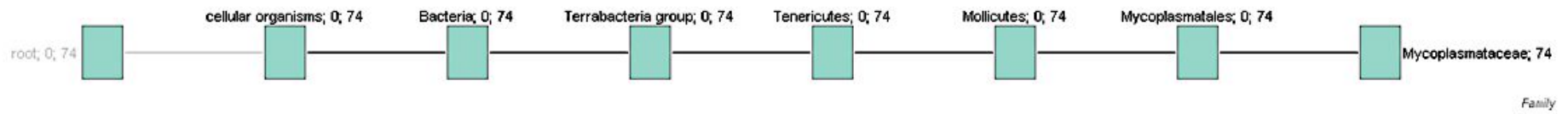
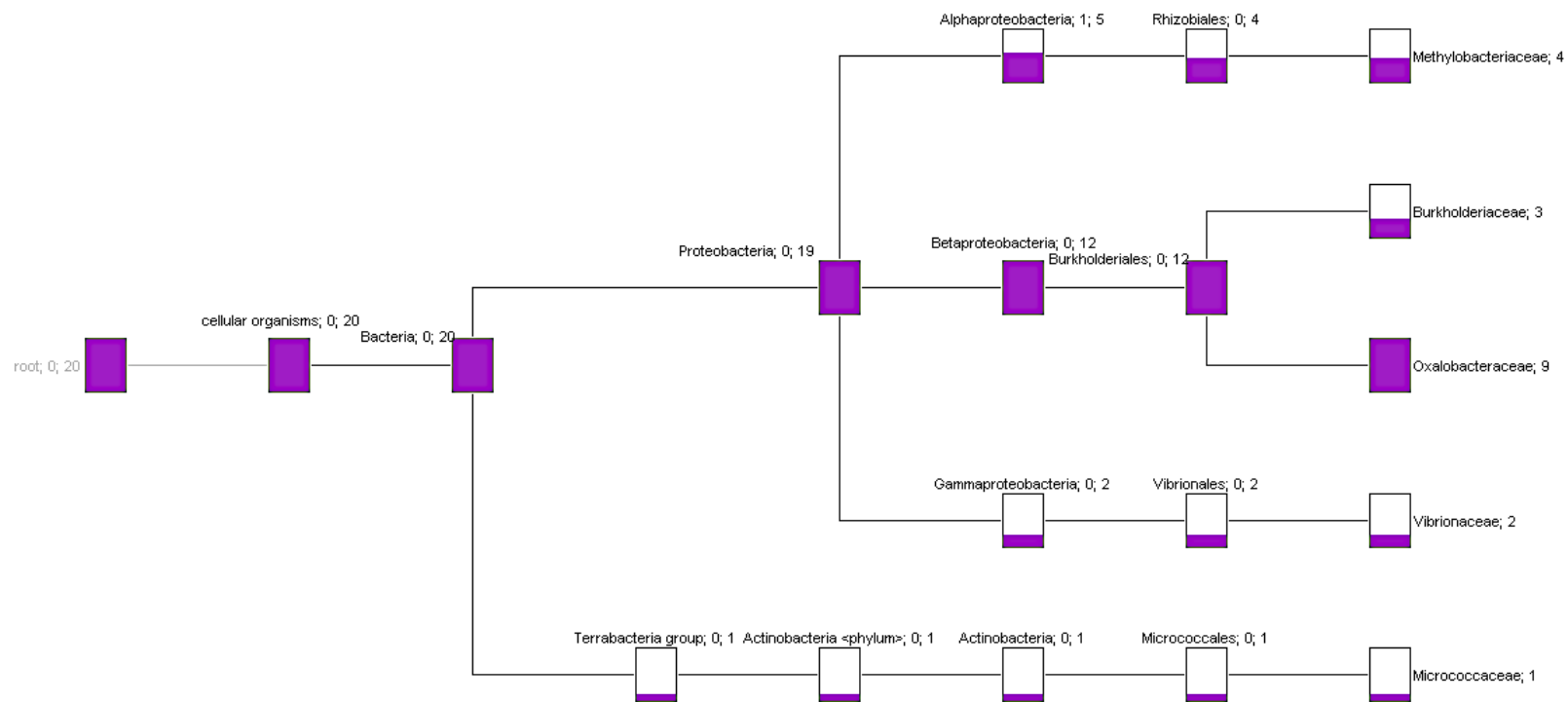


Figura 3.11: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do hepatopâncreas (HP) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.



Family

Figura 3.12: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do hepatopâncreas (HP) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

3.5.4. Caracterização do microbioma associada ao divertículo em animais AA

O microbioma total (fig. 3.13) foi obtido com base em 64 leituras resumidas a 4 famílias, *Vibrionaceae*, *Oxalobacteraceae* em Proteobacteria, *Spirochaetaceae* (Spirochaete) e *Mycoplasmataceae* (Tenericute), representada com 59 leituras.

O microbioma fundamental (fig. 3.14) compreendeu 59 leituras, todas atribuídas à família *Mycoplasmataceae*.

O microbioma raro (fig. 3.15) foi constituído por 5 leituras, atribuídas a *Vibrionaceae*, *Oxalobacteraceae* e *Spirochaetaceae*, e com exclusão de *Mycoplasmataceae*.

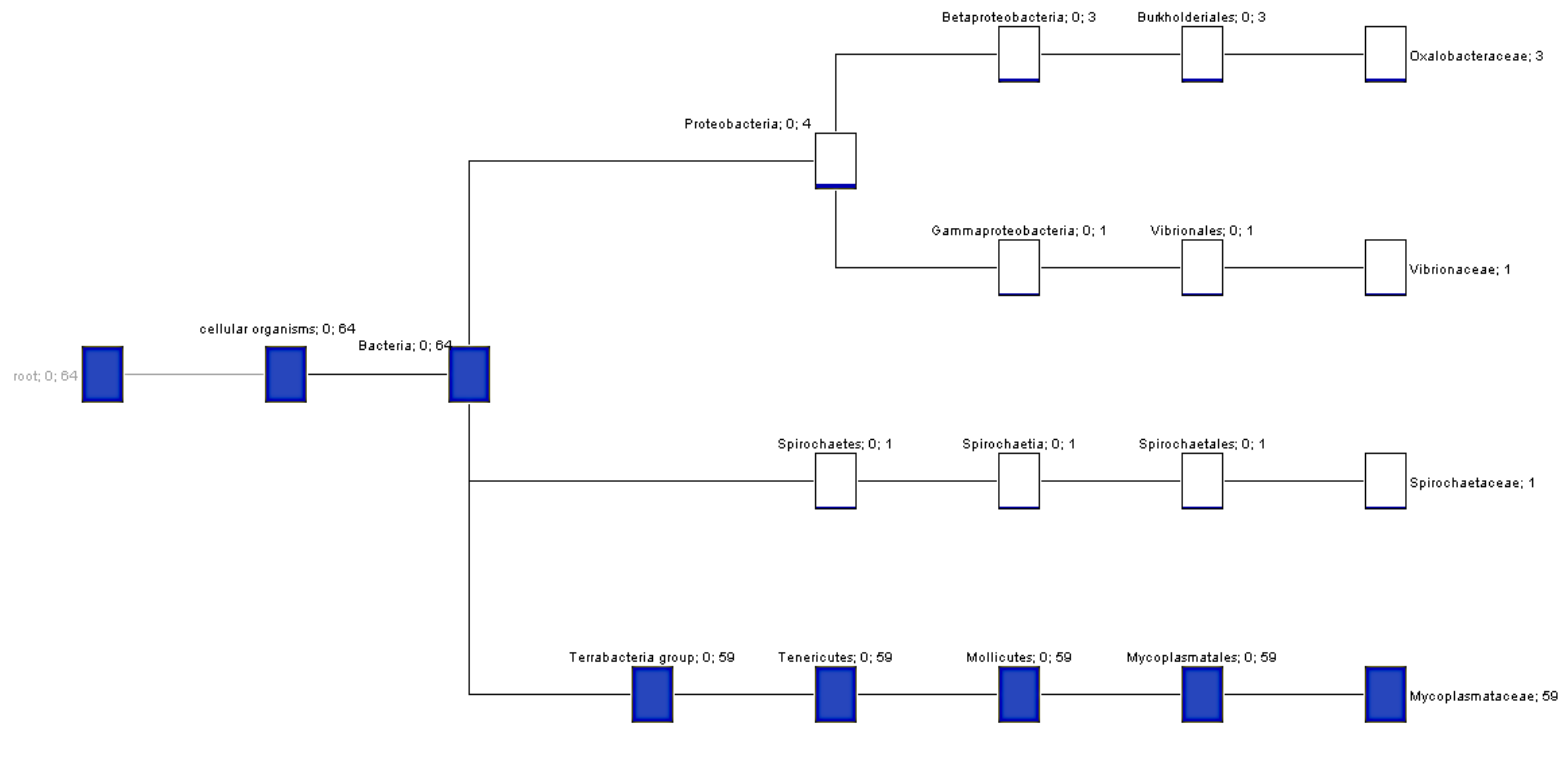


Figura 3.13: Diversidade taxonómica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do divertículo (DIVERT) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonómicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonómica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

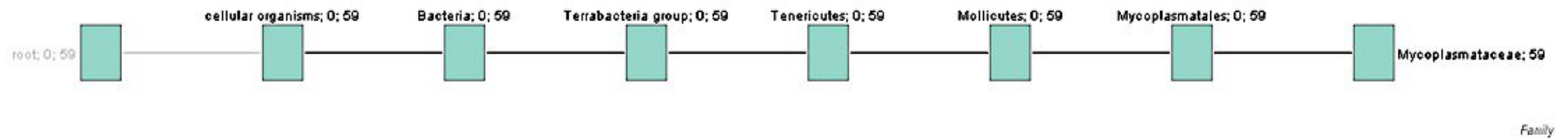
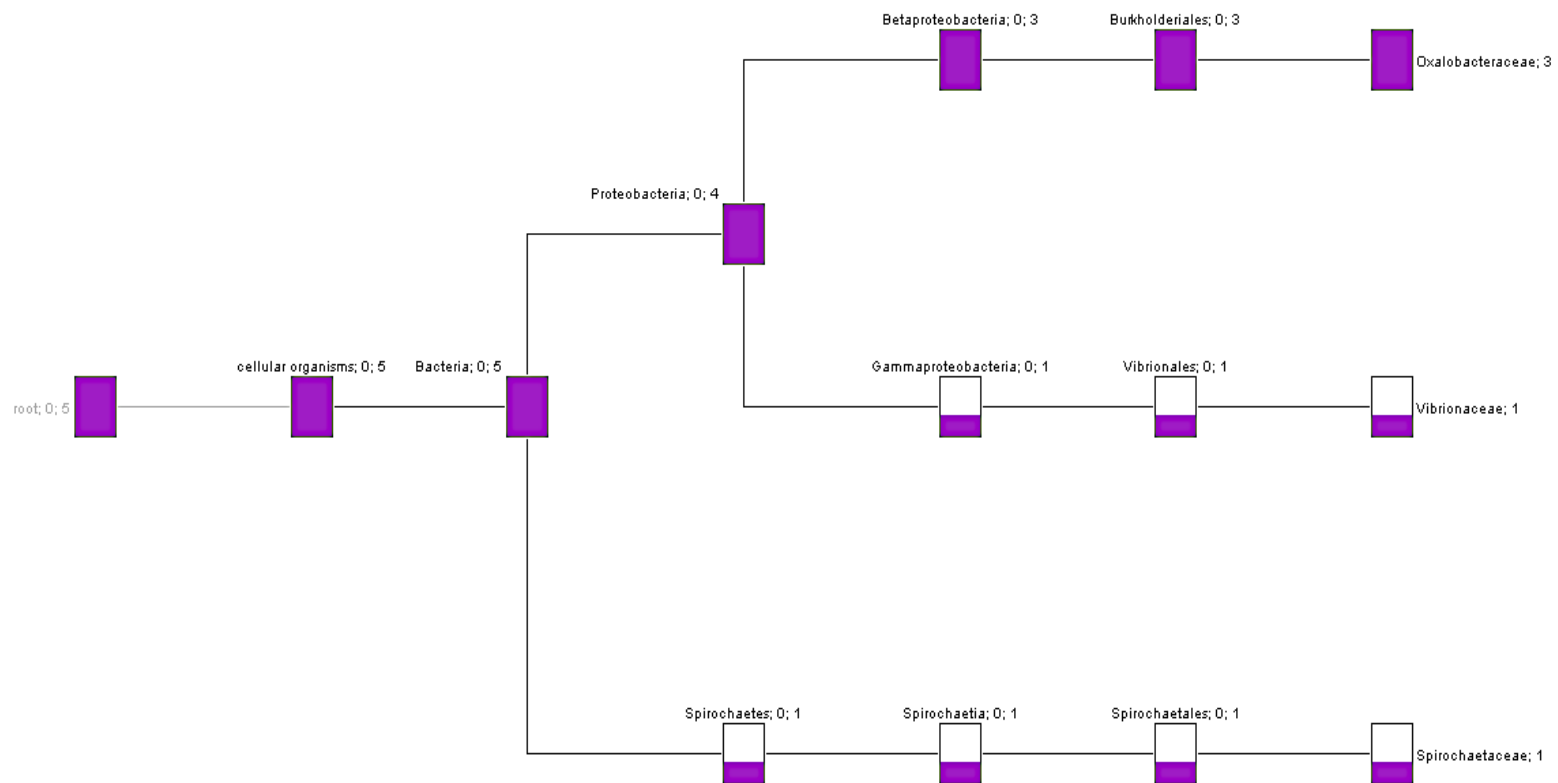


Figura 3.14: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do divertículo (DIVERT) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

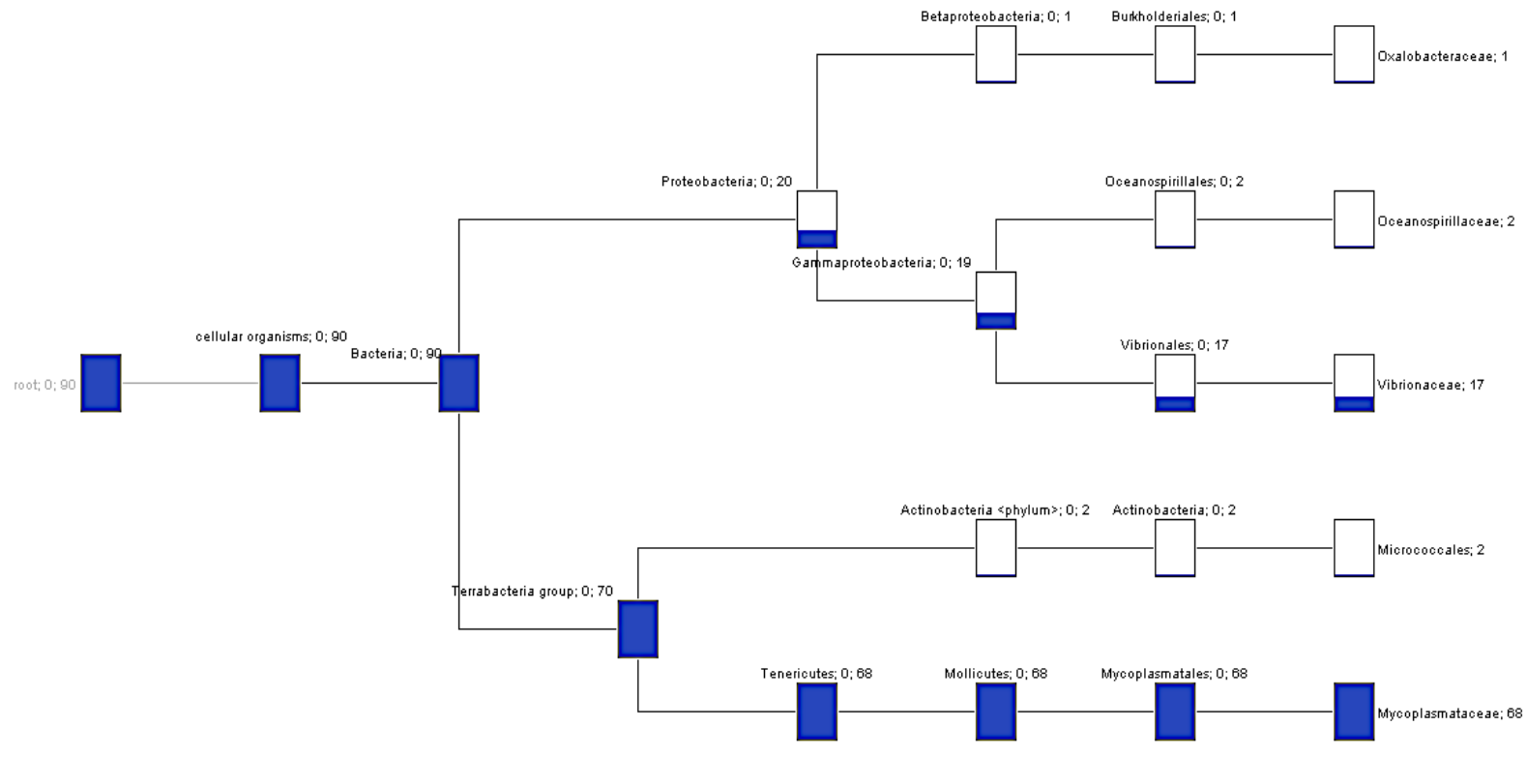


Family

Figura 3.15: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do divertículo (DIVERT) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (Lowest Common Ancestor) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

3.5.5. Caracterização do microbioma associada ao estômago em animais AA

No estômago o microbioma total (fig. 3.16) foi constituído por 90 leituras, das quais 2 atribuídas à ordem *Micrococcales* e 88 atribuídas a 4 famílias: *Oxalobacteraceae*, *Oceanospirillaceae* e *Vibrionaceae* do grupo Proteobacteria, e *Mycoplasmataceae* do grupo Tenericutes. O microbioma fundamental foi exclusivamente constituído *Mycoplasmataceae* (fig. 3.17) com 64 leituras. O microbioma raro (fig. 3.18) foi constituído por 26 leituras distribuídas pelos mesmo táxones do microbioma total. A inspeção detalhada ao nível das espécies permitiu verificar que as 4 leituras atribuídas a *Mycoplasmataceae* no microbioma raro correspondiam a uma espécie de micoplasma diferente das espécies de micoplasmas a que correspondiam as 64 leituras do microbioma fundamental.



Family

Figura 3.16: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do estômago (E) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

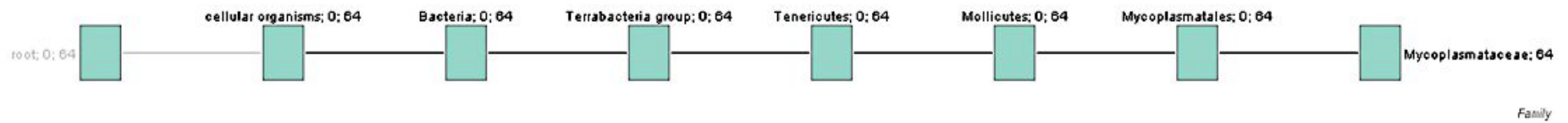
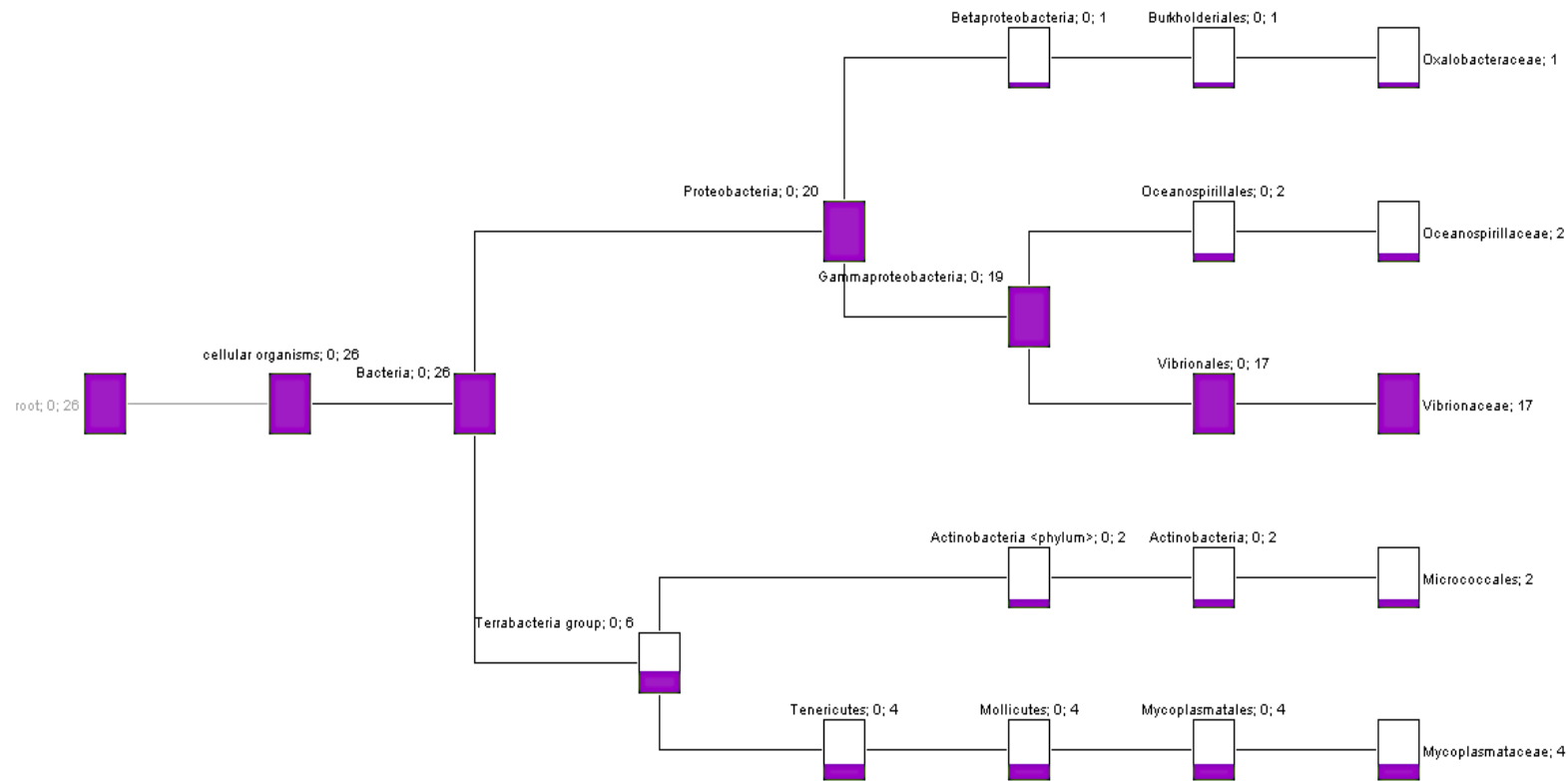


Figura 3.17: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do estômago (E) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.



Family

Figura 3.18: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do estômago (E) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

3.5.6. Caracterização do microbioma associada ao ceco em animais AA

Os resultados da determinação do microbioma total (fig. 3.19) indicaram que as 93 leituras normalizadas corresponderam a *Mycoplasmataceae*. Igualmente, o microbioma fundamental (fig. 3.20), com 92 leituras normalizadas foi composto exclusivamente por *Mycoplasmataceae*.

Com o perfil taxonómico encontrado para cada indivíduo para este compartimento não há lugar ao cálculo do microbioma raro.

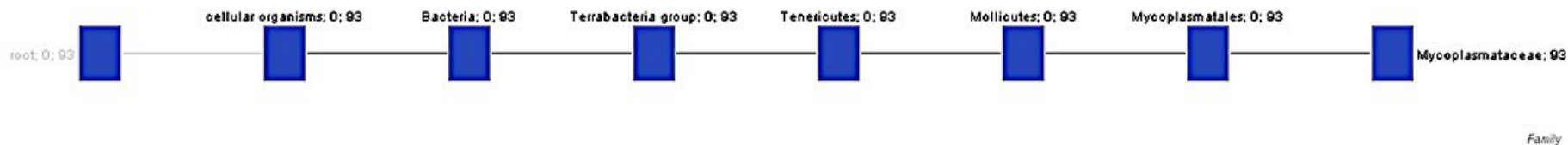


Figura 3.19: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do ceco (C) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

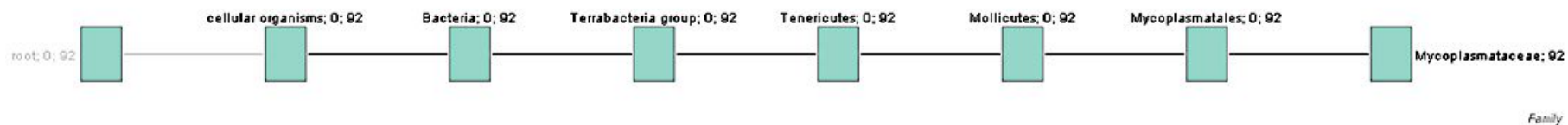


Figura 3.20: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do ceco (C) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

3.5.7. Caracterização do microbioma associada ao intestino em animais AA

A determinação do microbioma total (fig. 3.21) indicou que as 93 leituras normalizadas foram atribuídas a 5 famílias, *Flavobacteriaceae* (Bacteroidetes), *Oceanospirillaceae*, *Litoricolaceae*, *Vibrionaceae* (Proteobacterias) e *Mycoplasmataceae* (Tenericutes). O microbioma fundamental (fig. 3.22) foi constituído em exclusivo por *Mycoplasmataceae*, com 88 leituras. O microbioma raro foi constituído por 5 leituras correspondentes a 4 famílias do microbioma total, com ausência de *Mycoplasmataceae* (fig. 3.23).

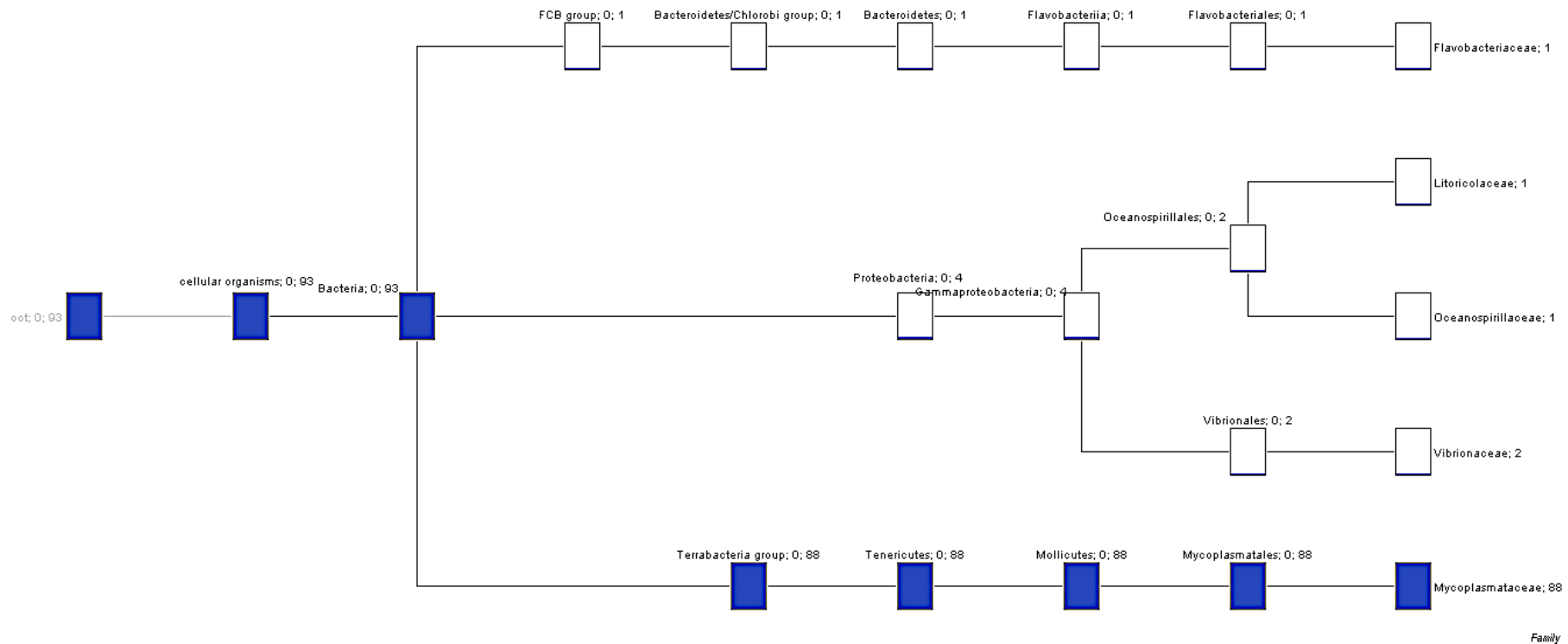


Figura 3.21: Diversidade taxonómica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA). O cladograma mostra os grupos taxonómicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonómica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

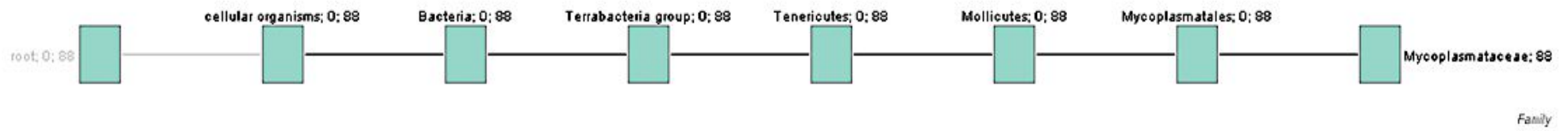


Figura 3.22: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

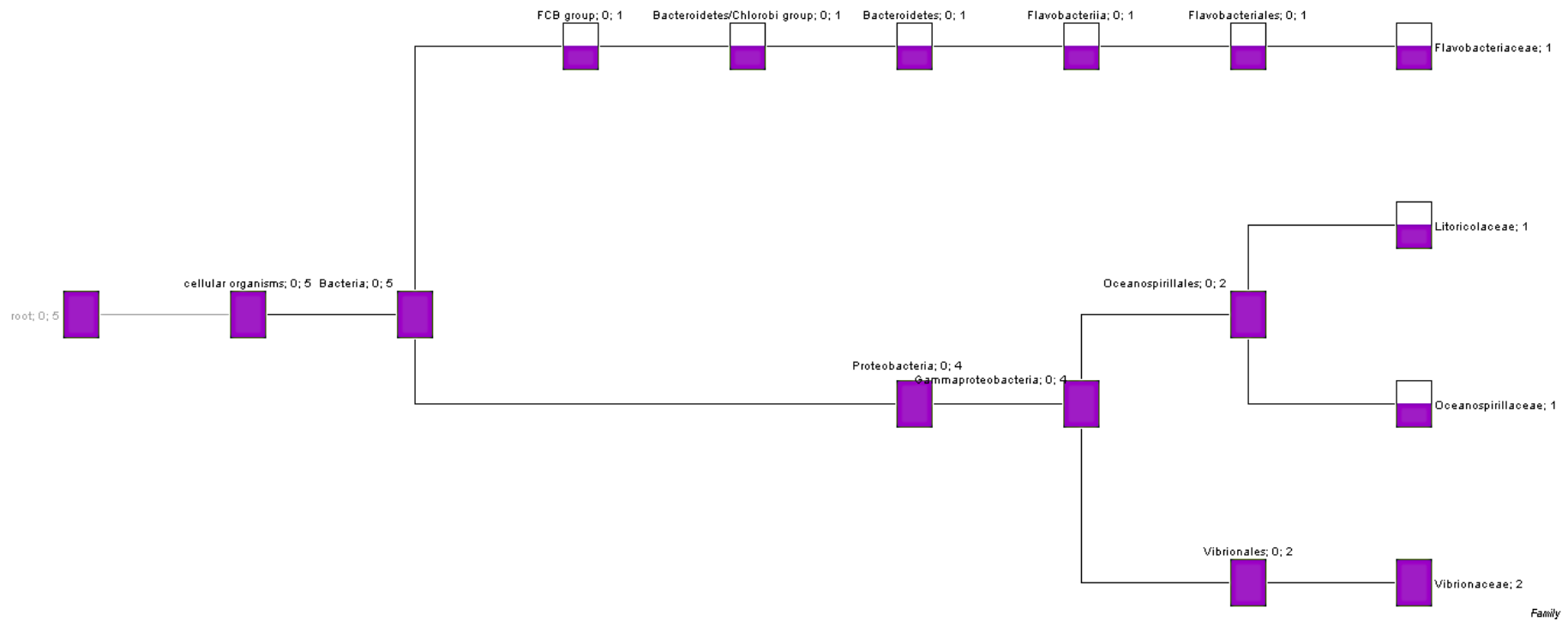


Figura 3.23: Diversidade taxonômica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas das amostras do intestino (I) de indivíduos amostrados antes da alimentação (AA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

3.5.8. Caracterização do microbioma associada à hemolinfa em animais DA

A análise do microbioma total nas amostras da hemolinfa (fig. 3.24) dos animais amostrados depois da alimentação (DA) incluiu 94 leituras, das quais 1 atribuída à ordem *Sphingomonadales*. As restantes 90 leituras foram atribuídas a 10 famílias: *Methylobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Enterobacteriaceae*; *Alcanivoraceae*, *Moraxellaceae* e *Vibrionaceae* em Proteobacteria, *Micrococcaceae* em Actinobacteria e *Mycoplasmataceae* em Tenericutes. O microbioma fundamental foi constituído de uma única família, *Mycoplasmataceae* (fig. 3.25), com 66 leituras. O microbioma raro (fig. 3.26) foi constituído por 28 leituras, das quais 24 corresponderam a 9 famílias, todas as que fazem parte do microbioma total, com exceção de *Mycoplasmataceae*, e 1 leitura correspondeu à ordem *Sphingomonadales*.

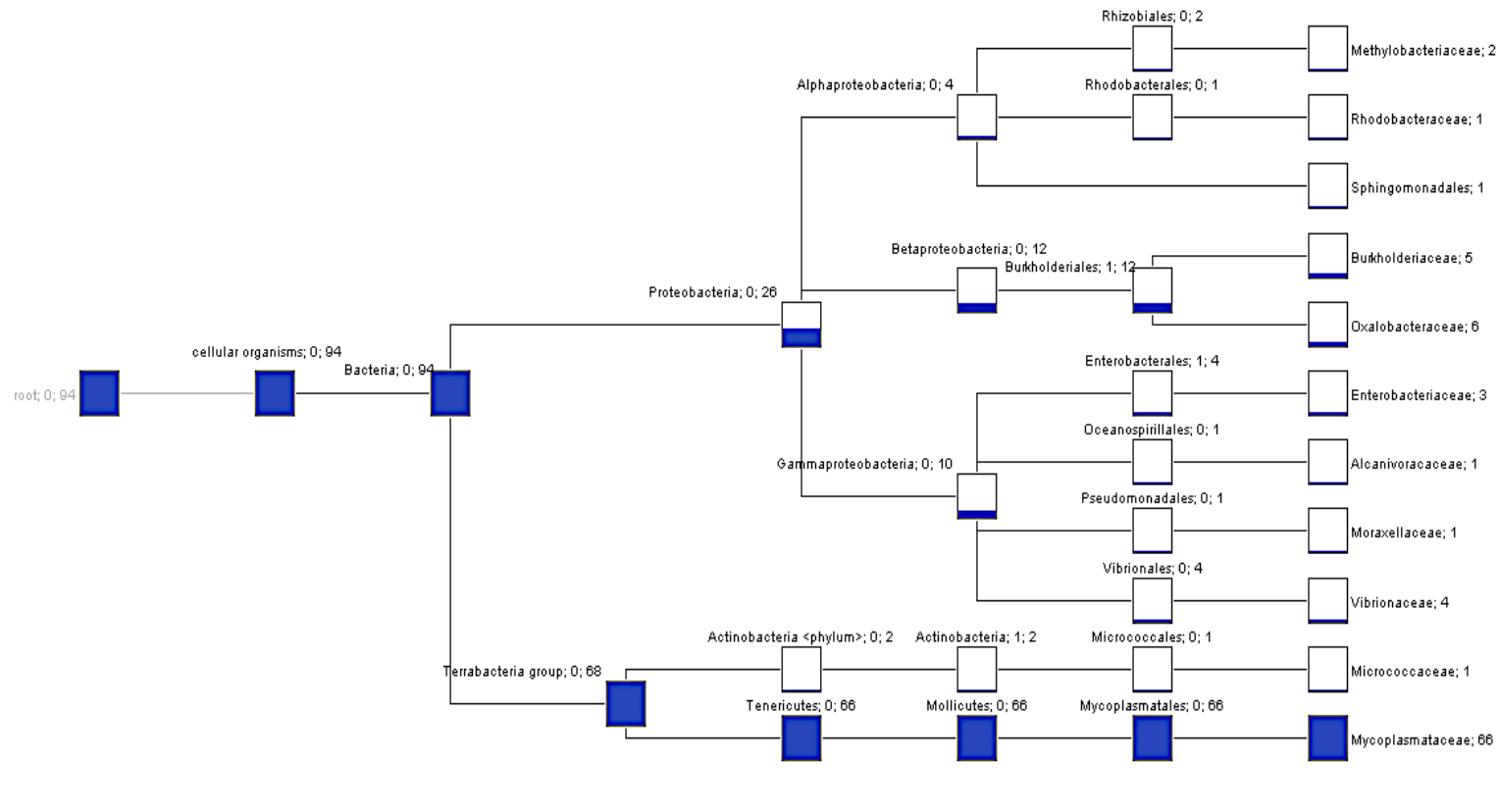


Figura 3.24: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas de hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

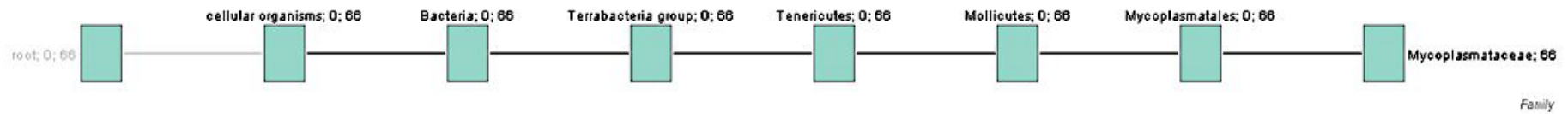
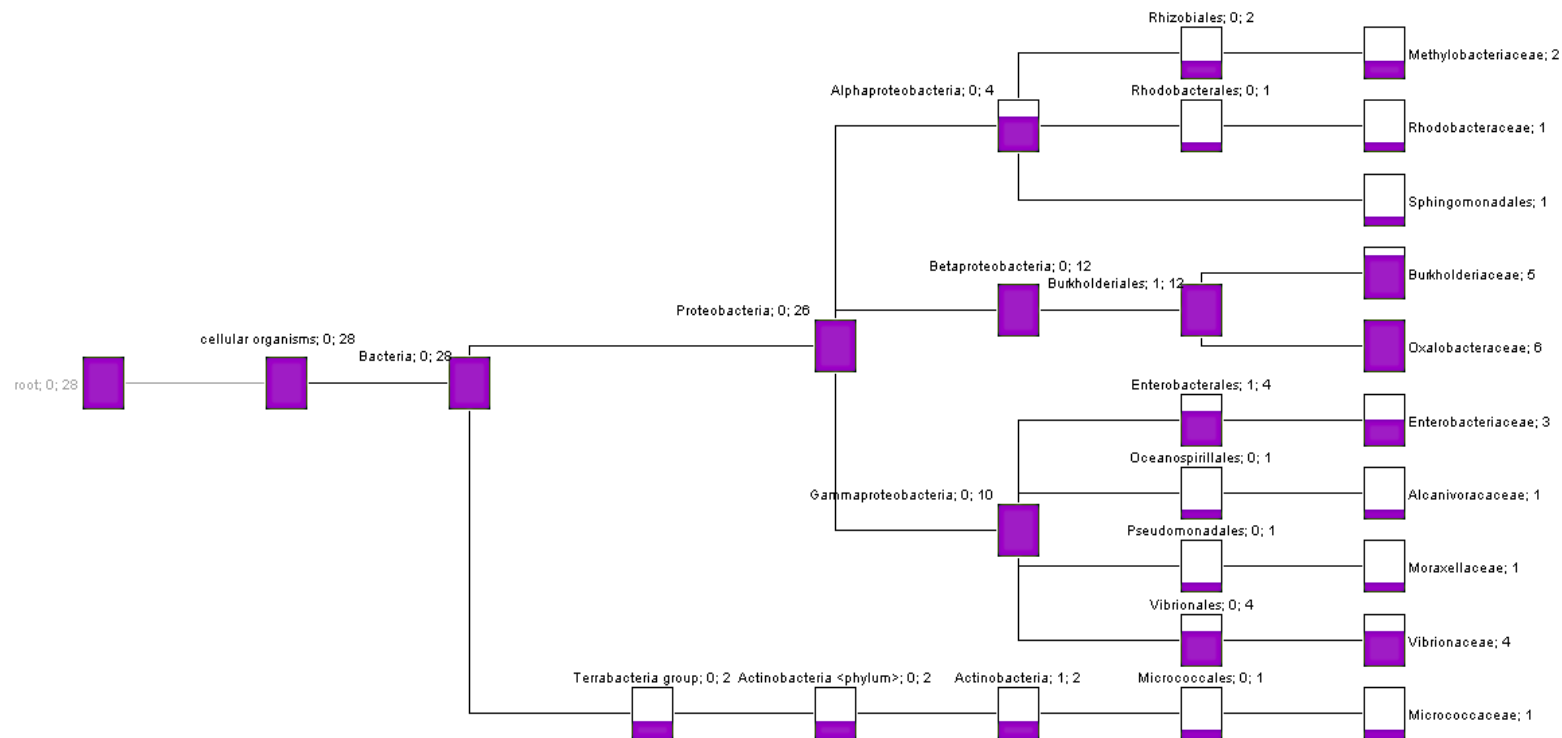


Figura 3.25: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 5%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.



Family

Figura 3.26: Diversidade taxonómica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas da hemolinfa (HL) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonómicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonómica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

3.5.9. Caracterização do microbioma associada ao intestino em animais DA

Os resultados da análise do microbioma total (fig. 3.27) nas amostras do intestino de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA) revelaram que foi constituída de 93 leituras, das quais 2 correspondentes a *Cyanobacteria* e 1 a *Micrococcales* e as restantes 90 leituras foram correspondentes a 2 famílias, *Spirochaetaceae* (2 leituras) e *Mycoplasmataceae* com 88 leituras. O microbioma fundamental (fig. 3.28) foi constituído de uma única família, *Mycoplasmataceae* enquanto o microbioma raro (fig. 3.29) foi constituído de 5 leituras atribuídas a *Cyanobacteria* (2 leituras), *Micrococcales* (1 leitura) e à família *Spirochaetaceae* (1 leitura).

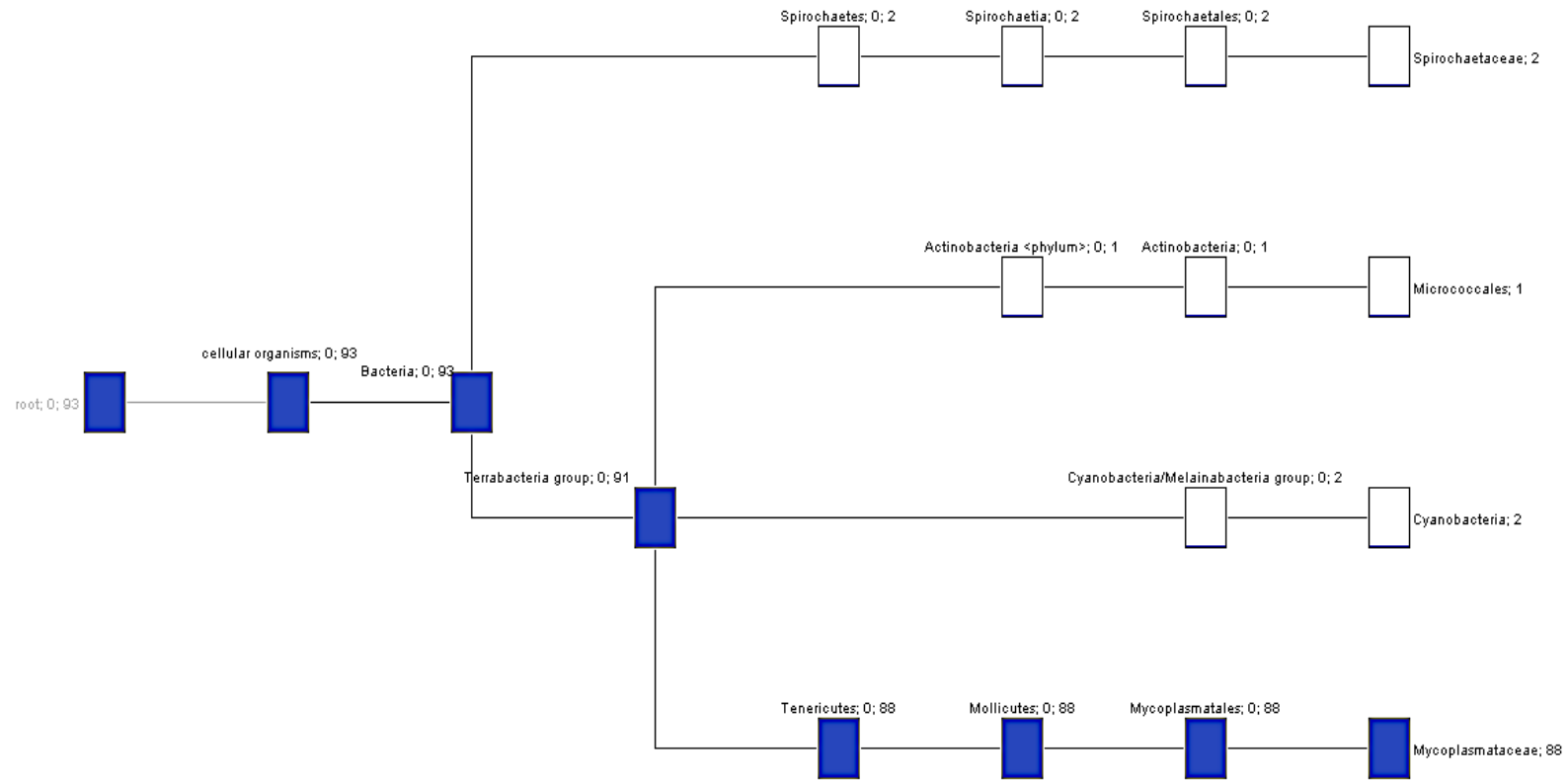


Figura 3.27: Diversidade taxonômica do microbioma total, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível da família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

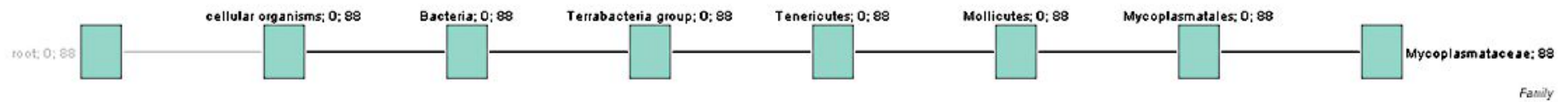


Figura 3.28: Diversidade taxonômica do microbioma fundamental, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA), considerando sequências presentes em todas as amostras com uma frequência de pelo menos 25%. O cladograma mostra os grupos taxonômicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonômica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

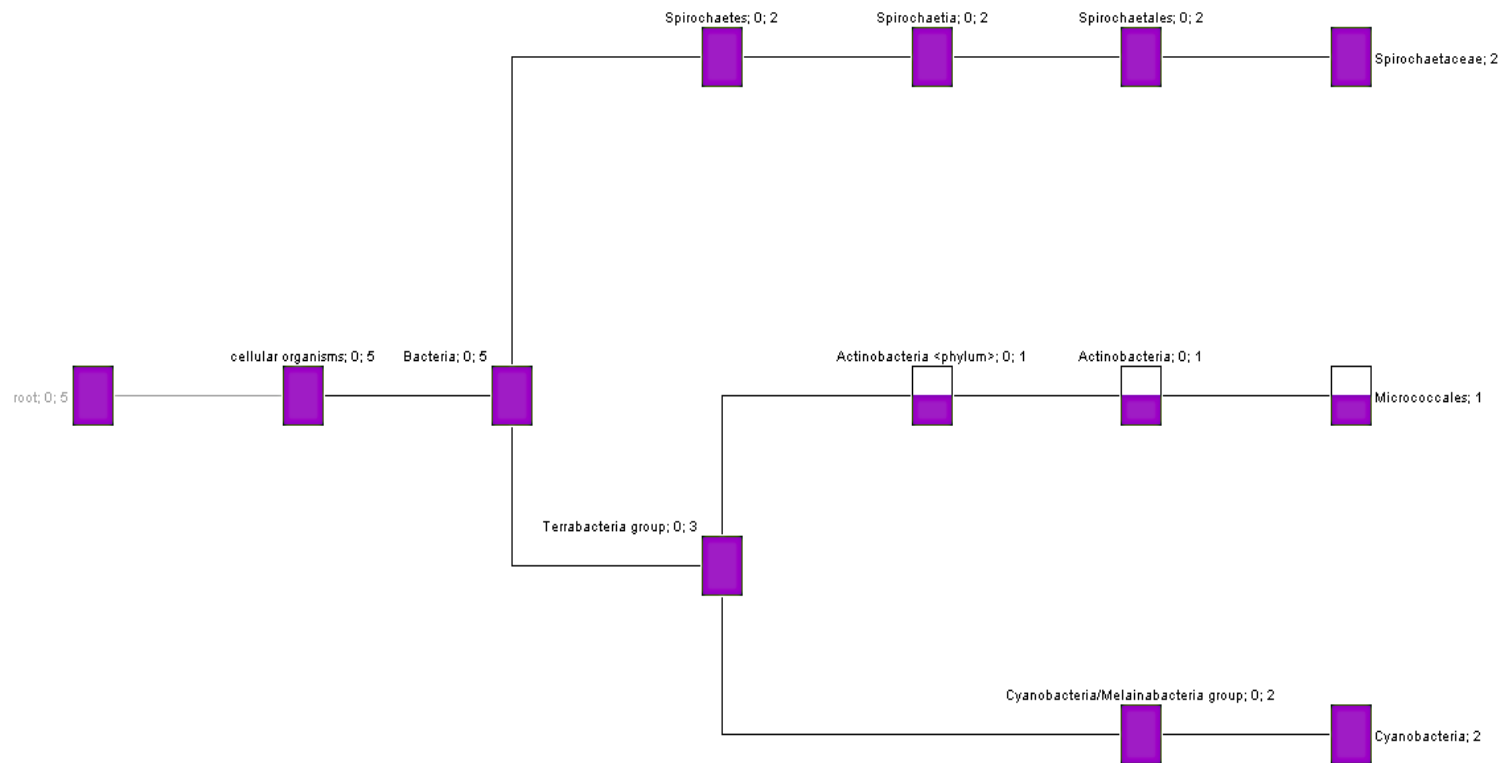


Figura 3.29: Diversidade taxonómica do microbioma raro, determinada com base nas sequências obtidas do intestino (I) de indivíduos amostrados depois da alimentação (DA), considerando sequências presentes em 50% das amostras com uma frequência de até 1%. O cladograma mostra os grupos taxonómicos identificados até ao nível de família, bem como o número de sequências atribuídas e resumidas para cada táxon. A atribuição taxonómica das sequências foi determinada com base no algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) e com o número máximo de correspondência por leitura de 100 na análise BLAST.

3.6. Índices de diversidade dos microbiomas

Nas tabelas seguintes estão mostrados os valores do índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') e de Simpson recíproco (D'), para os microbiomas totais (tabela 3.5) e raros (tabela 3.6). No caso do microbioma fundamental, que em todos os casos foi constituído pela família *Mycoplasmataceae*, os valores daqueles índices são de 0 e 1 respetivamente.

Tabela 3.5: Diversidade do microbioma total na hemolinfa (**HL**) e no trato digestivo (**TC**: esófago; **HP**: hepatopâncreas; **DIV**: divertículo; **E**: estômago; **C**: ceco e **I**: intestino) em indivíduos amostrados antes da alimentação (AA) e em indivíduos amostrados depois da alimentação (DA). Os índices de diversidade do microbioma total foram estimados ao nível da família com base na informação do número de leituras normalizadas para cada compartimento.

| Compartimento | Nº de leituras | Nº de famílias | Índice de diversidade | |
|---------------|----------------|----------------|-----------------------|--------------|
| | | | H' | D' |
| HL (AA) | 92 | 16 | 3,223 | 7,079 |
| HL (DA) | 90 | 10 | 1,594 | 1,820 |
| TC (AA) | 97 | 9 | 1,984 | 3,017 |
| HP (AA) | 94 | 6 | 1,133 | 1,548 |
| DIVERT* (AA) | 64 | 4 | 0,503 | 1,173 |
| E (AA) | 90 | 4 | 0,943 | 1,575 |
| C (AA) | 93 | 1 | 0,000 | 1,000 |
| I (AA) | 93 | 5 | 0,406 | 1,116 |
| I (DA) | 93 | 2 | 0,154 | 1,045 |

*resulta de dois indivíduos

Tabela 3.6: Diversidade do microbioma raro na hemolinfa (**HL**) e no trato digestivo (**TC**: tubo central; **HP**: hepatopâncreas; **DIVERT**: divertículo; **E**: estômago; **C**: ceco e **I**: intestino) em indivíduos amostrados antes da alimentação (**AA**) e em indivíduos amostrados depois da alimentação (**DA**). Os índices de diversidade do microbioma raro foram estimados ao nível da família, com base na informação do número de leituras normalizadas para cada compartimento.

| Compartimento | Nº de leituras | Nº de famílias | Índice de diversidade | |
|---------------|----------------|----------------|-----------------------|--------------|
| | | | <i>H'</i> | <i>D'</i> |
| HL (AA) | 72 | 16 | 3,269 | 6,987 |
| HL (DA) | 24 | 9 | 2,840 | 6,128 |
| TC (AA) | 49 | 8 | 1,948 | 2,946 |
| HP (AA) | 20 | 5 | 1,970 | 3,252 |
| DIVERT* (AA) | 5 | 3 | 1,371 | 2,273 |
| E (AA) | 26 | 4 | 1,273 | 1,858 |
| C (AA) | n/a | n/a | n/a | n/a |
| I (AA) | 5 | 4 | 1,922 | 3,571 |
| I (DA) | 2 | 1 | 0,000 | 1,000 |

*resulta de dois indivíduos, n/a: não aplicável.

Verifica-se que o compartimento com maior diversidade taxonómica é o da hemolinfa, quer nos indivíduos AA quer nos DA. Observa-se também que nos indivíduos DA há uma diminuição da diversidade taxonómica quer em HL quer em I (valores a negrito), em relação aos indivíduos AA.

3.7. Efeito da alimentação no microbioma da hemolinfa e do intestino

Para além da diminuição nos índices de diversidade que se verifica nos microbiomas de indivíduos DA, observa-se também diferenças na qualidade do perfil taxonómico entre animais amostrados antes e depois da alimentação (AA vs. DA).

No caso da hemolinfa (fig. 3.30) verifica-se que *Enterobacteriaceae*, *Alcanivoraceae*, *Moraxellaceae* e *Micrococcaceae* foram encontradas somente nas amostras de indivíduos DA. *Pelagibacteraceae*, *Rhodospirillaceae*, *Comamonadaceae*, *Colwelliaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Shewanellaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Campylobacteraceae*, *Propionibacteriaceae* e *Flavobacteriaceae* foram específicas das amostras de indivíduos AA. *Methylobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Vibrionaceae* e *Mycoplasmataceae* foram encontradas em ambos grupos (AA e DA).

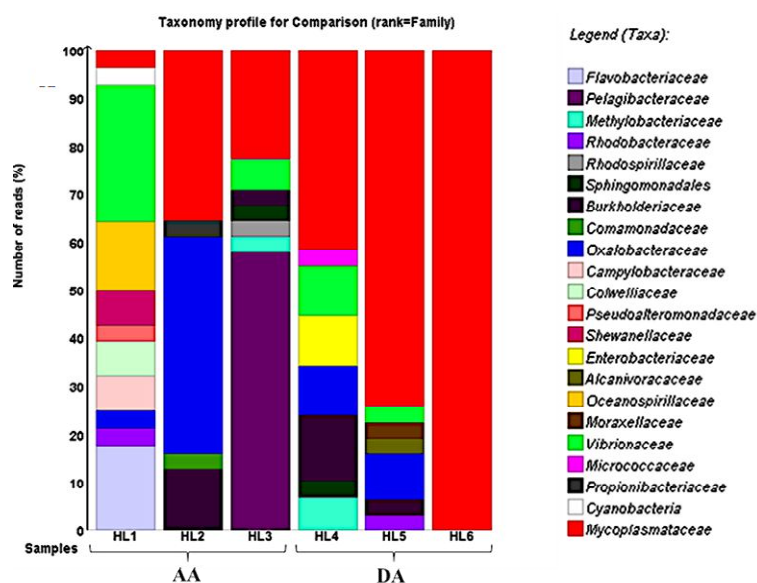


Figura 3.30: Comparação do perfil taxonómico do microbioma das amostras de hemolinfa dos indivíduos amostrados antes e depois da alimentação (AA vs. DA). O perfil taxonómico mostra os táxones ao nível da família e a percentagem de leituras em cada família.

No caso do intestino (fig. 3.31), verifica-se que *Mycoplasmataceae* foi encontrada em ambos os grupos de amostras. No entanto *Spirochaetaceae* foi específica dos animais DA, enquanto que *Flavobacteriaceae*; *Oceanospirillaceae*, *Litoricolaceae* e *Vibrionaceae* somente foram encontradas nas amostras dos animais amostrados antes da alimentação (AA).

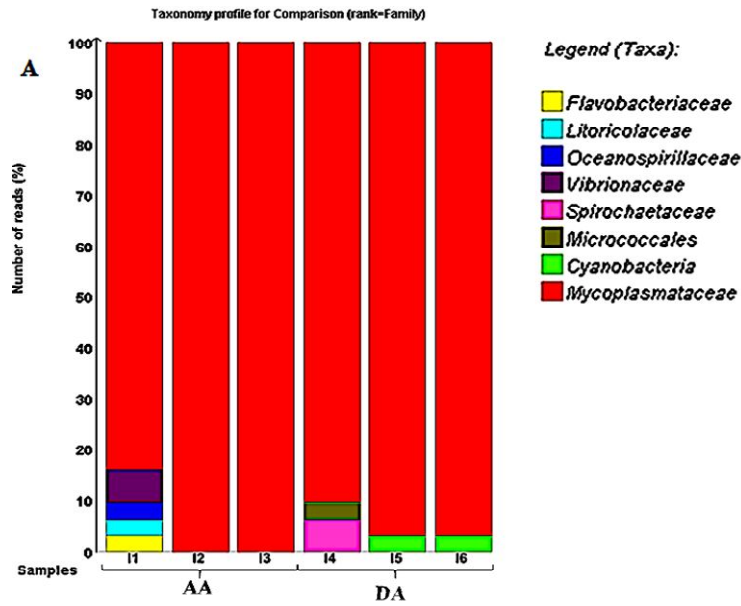


Figura 3.31: Comparação do perfil taxonômico do microbioma nas amostras do intestino dos indivíduos amostrados antes e depois da alimentação (AA vs. DA). O perfil taxonômico mostra os táxones ao nível da família e a percentagem de leituras em cada família.

O resultado da análise das proporções médias da abundância relativa dos táxones nas amostras da hemolinfa (fig. 3.32 A) e do intestino (fig. 3.32 B) dos indivíduos amostrados antes (AA) e depois da alimentação (DA) mostraram variações significativas entre as comunidades microbianas dos animais alimentados e não alimentados somente para os grupos que são exclusivos de AA ou de DA. No caso de *Mycoplasmataceae* na hemolinfa, a diferença entre AA e DA apresenta o valor de $P = 0,064$ no teste t-Student.

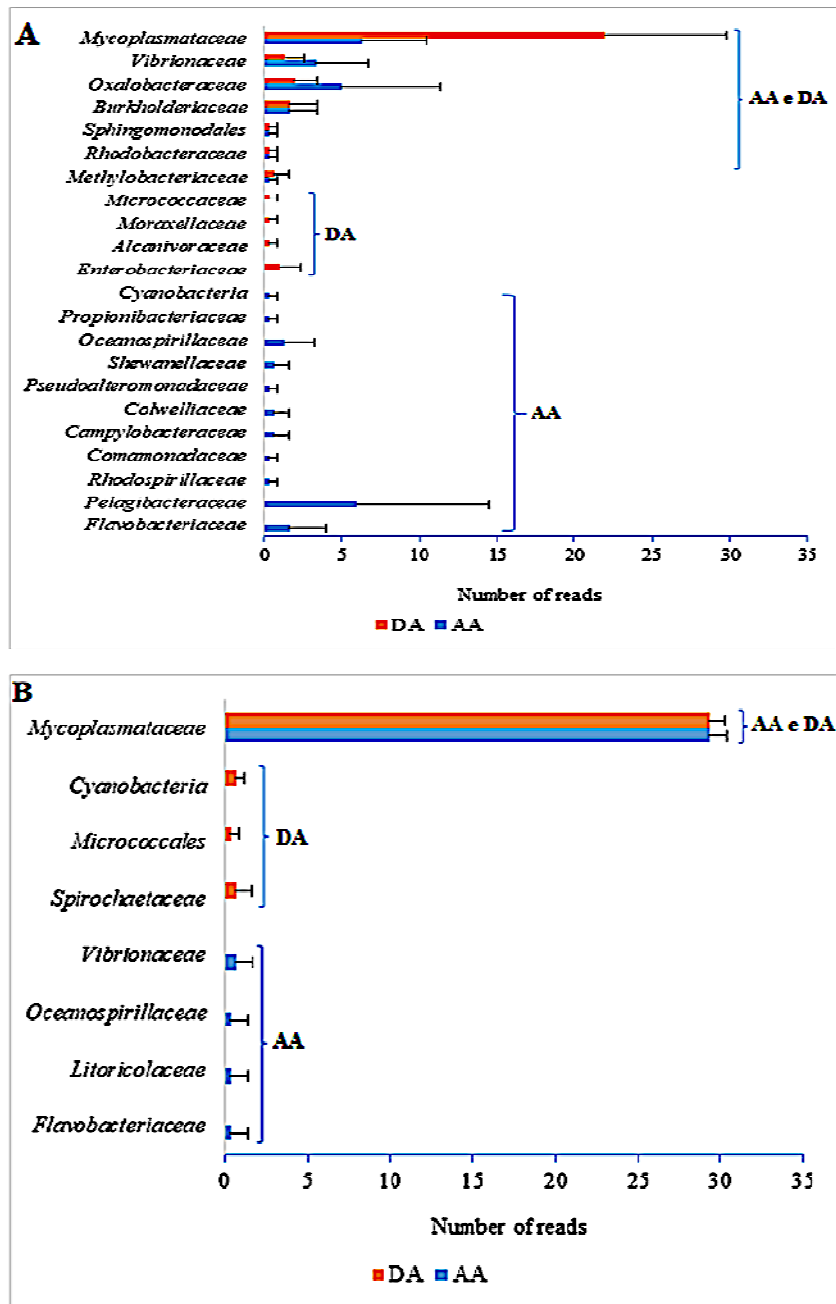


Figura 3.32: Representação gráfica do número de leituras (media de 3 indivíduos \pm desvio padrão) obtidas para os táxones das amostras da hemolinfa (A) e das amostras do intestino (B) de indivíduos amostrados antes (AA) e depois da alimentação (DA).

Para avaliar o grau de relação das comunidades bacterianas nas diferentes amostras do intestino e da hemolinfa dos indivíduos amostrados antes e depois da alimentação, os dados foram apresentados com relação às diferenças. A posição relativa dos

grupos taxonômicos na análise de coordenadas principais permitiu visualizar o grau de relacionamento entre os dois grupos de amostras com dependência dos táxones nelas existentes.

As componentes PC1 (46,8%) e PC2 (26,8%); PC1 (85,8%) e PC2 (14,2%) explicaram a variação total de cada componente na hemolinfa (fig. 3.33) e intestino (fig. 3.34) respectivamente. Os valores positivos ou negativos em cada componente indicam, respectivamente, a maior ou a menor correlação das amostras dos indivíduos amostrados antes e depois da alimentação. Assim, para a hemolinfa, os valores positivos na componente PC1 foi estimulada positivamente pelo microbioma raro: *Burkholderiaceae* e *Oxalobacteraceae* e negativamente por *Flavobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, também do microbioma raro.

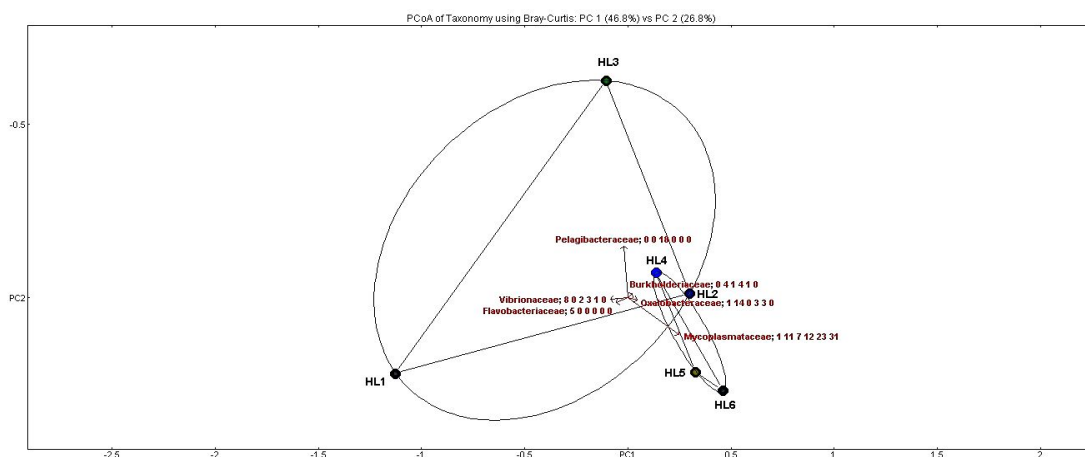


Figura 3.33: Análise de coordenadas principais (PCoA), mostrando as comunidades microbianas existentes na hemolinfa de animais amostrados antes da alimentação (HL1, HL2 e HL3) e alimentados (HL4, HL5 e HL6). As componentes PC1 (46,8%) e PC2 (26,8%) mostram a variação total nas comunidades bacterianas. A distância de todos os círculos representa as diferenças de dissimilaridade de Bray-Curtis entre as amostras.

Enquanto à componente PC2, o valor positivo foi definido pela família *Mycoplasmataceae* (microbioma fundamental) e negativamente pela família *Pelagibacteraceae* (microbiota rara). Para o intestino, a componente PC1, mostrou apenas valores negativos, foram estimulados pelas famílias *Flavobacteriaceae*,

Litoricolaceae, *Oceanospirillaceae* e *Vibrionaceae* (todas pertencentes ao microbioma raro). Na componente PC2, os valores positivos foram determinados por *Mycoplasmataceae* (microbioma fundamental) e os valores negativos por *Spirochaetaceae* (microbioma raro). A análise das coordenadas principais mostrou uma separação das amostras de hemolinfa dos animais alimentados (HL4, HL5 e HL6) e dos não alimentados (HL1, HL2 e HL3). Esta situação não se verifica para o intestino em que não há diferenciação entre as amostras dos animais alimentados (I4, I5 e I6) e não alimentados (I1, I2 e I3).

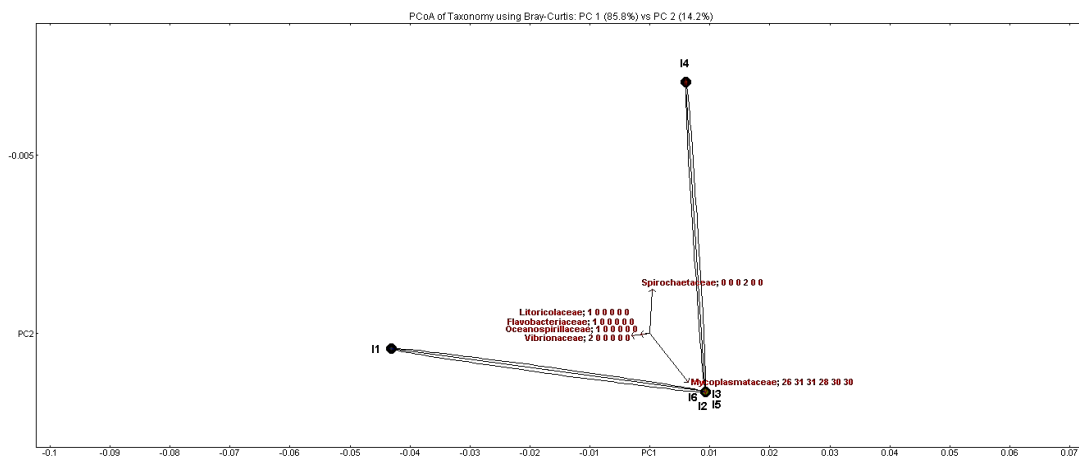


Figura 3.34: Análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas do intestino de animais não alimentados (I1, I2 e I3) e alimentados (I4, I5 e I6). As componentes PC1 (85,8%) e PC2 (14,2%) mostram a variação total nas comunidades bacterianas. A distância de todos os círculos representa as diferenças de dissimilaridade de Bray-Curtis entre as amostras.

CAPÍTULO IV: DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

4.1. Discussão

Atualmente, os estudos fundamentais na alimentação/nutrição no choco, abordam sobretudo a composição lipídica do manto (Almansa *et al.*, 2006), o efeito de alimentos congelados, naturais e artificiais no crescimento (Ferreira *et al.*, 2009; Domingues *et al.*, 2001; Koueta *et al.*, 2002; Sykes *et al.*, 2013), as respostas metabólicas à privação de alimento (Lamarre *et al.*, 2016), os efeitos no sistema imunitário (Le Pabic *et al.*, 2014), a taxa e capacidade enzimática na maturação do trato digestivo na fase inicial de vida e na modulação das vias metabólicas durante os períodos de jejum (Safi *et al.*, 2017; Speers-Roesch *et al.*, 2016). A maior parte desta investigação está dirigida de forma direta ou indireta a encontrar alternativas para nutrição do choco e outros cefalópodes (Martínez-Montaña *et al.*, 2017) com formulações de ração baseadas nas necessidades nutricionais da espécie. Esta estratégia poderá consequentemente, melhorar o cultivo do choco em escala comercial e favorecer um cultivo sustentável.

No entanto, dentro do contexto funcional do sistema digestivo do choco, uma das áreas não tem recebido muita atenção é a microbiota e a composição taxonómica da microflora do sistema digestivo e circulatório do choco. Esta situação surpreendente dada as evidências crescentes da importância funcional da microbiota tanto em vertebrados superiores como inferiores. O seu efeito é importante no estabelecimento tanto de relações mutualísticas benéficas como do controlo dos processos metabólicos, fisiológicos e imunes, sobretudo no aparelho digestivo. Embora este efeito é propagado ao nível do organismo.

Neste trabalho, e com base na análise molecular das regiões variáveis do 16S ribossomal, foram obtidas informações da microbiota bacteriana associada ao sistema circulatório e a todas as regiões anatómicas individualizadas do sistema digestivo do choco, e foi ainda analisada a influência da alimentação/jejum na a diversidade e composição da microbiota. Na maior parte dos estudos que analisam a microbiota do trato digestivo e hemolinfa é comum agrupar as amostras em “pools”, dum indivíduo ou

de um grupo experimental. Esta estratégia não permite analisar o contributo de cada indivíduo, ou porção anatómica; na microbiota total. No entanto, neste trabalho, sendo o primeiro na área do microbioma digestivo de choco, analisaram-se as amostras individualmente por região anatómica. Uma das conclusões evidentes desta aproximação, é que se verificou que nem todos os indivíduos têm a mesma contribuição para a composição e diversidade global do microbioma. Foi identificado ainda um problema para análise dos dados, a escassez de estudos para comparação da microbiota nos cefalópodes, particularmente no choco. É por isso que os resultados aqui descritos são contextualizados na sua maior parte com estudos semelhantes em peixes.

Os resultados de distribuição taxonómica obtidos na hemolinfa mostram que o microbioma fundamental foi constituído por dois grupos, ordem *Burkholderiales* (Proteobacteria) e família *Mycoplasmataceae* (Tenericutes). Adicionalmente, em todos os compartimentos individuais do trato digestivo o microbioma fundamental foi constituído exclusivamente da família *Mycoplasmataceae*, que surpreendentemente foi a única família presente em todas as amostras do ceco.

Apesar de ter uma distribuição diferenciada e a sua distribuição ser diferente nas amostras analisadas, os membros da família *Mycoplasmataceae* são colonizadores prominentes tanto no trato digestivo e na hemolinfa do choco. Este resultado experimental concorda com dados anteriores de Roura *et al.* (2017) que realizaram um estudo da microbiota do trato digestivo do polvo (*Octopus vulgaris*) e comprovaram a existência extensa de *Mycoplasma* em animais selvagens e em animais mantidos em cativeiro, embora com maior abundância nestes últimos. Os autores interpretam este dado experimental argumentando que este grupo de bactérias são oportunistas. Pela sua natureza saprófita a sua abundância no trato digestivo dos animais poderia estar relacionada com presença de restos de alimento vivo nos tanques de cultivo, que criaria condições favoráveis no tanque de cultivo para a sua proliferação. Por outro lado, ao analisarem o perfil da microbiota intestinal do salmão Atlântico Dehler *et al.* (2017) obtiveram resultados semelhantes. No entanto, os autores propõem que a presença de *Mycoplasmataceae*, pode ter importância para o ecossistema intestinal de salmonídeos,

que independentemente do estágio do ciclo de vida têm uma dependência nutricional de colesterol e outros esteróis, que podem ser fornecidos pelos membros da família *Mycoplasmataceae*.

Os membros da família *Mycoplasmataceae* constituem um grupo de microrganismos encontrados no trato digestivo de diversos grupos de animais marinhos. Existe pouca informação sobre as suas funções putativas no hospedeiro, embora alguns estudos mostram existência de comensalismo (King *et al.*, 2012; Green e Barnes, 2010; Tanaka *et al.*, 2004; Bano *et al.*, 2007; Kellogg *et al.*, 2009).

As *Burkholderiale*, constituem o segundo grupo do microbioma fundamental na hemolinfa dos indivíduos amostrados antes da alimentação, que na microbiota total foi classificada até a família. As *Burkholderiale* são consideradas por incluírem espécies com um papel metabólico, especialmente na biodegradação de compostos aromáticos (Pérez-Pantoja *et al.*, 2011). A diferença na atribuição da ordem (no microbioma fundamental) e família (no microbioma total) deve-se à restringência dos parâmetros atribuídos na análise bioinformática para a determinação do microbioma fundamental, em que foram consideradas todos os grupos presentes em todas as amostras e com uma frequência de até 5% ao nível da família.

A família *Vibrionaceae* foi identificado na maioria das amostras do trato digestivo e hemolinfa. Os membros desta família são potencialmente patogênicos para os invertebrados marinhos (Zhao *et al.*, 2012). No entanto, os animais amostrados estavam tanto quanto foi possível determinar, saudáveis e com boa capacidade de produção de gametas. A presença da família *Vibrionaceae* no microbioma de animais aparentemente saudáveis está provavelmente associado a dois aspetos: i) a estabilidade da microbiota rara na hemolinfa e no trato digestivo e uma potencial relação simbiótica com esta família para evitar a sua patogenicidade. Pode ser comprovado nos resultados deste trabalho, que em todas as amostras onde se verificou maior diversidade da microbiota rara foi encontrada menor presença de *Micoplasmataceae*; e ii) um sistema imunitário que potencialmente permita o choco contrariar a patogenicidade putativa dessas. O choco possui fatores humorais que incluem, principalmente, lectinas (aglutininas,

opsoninas) e mecanismos mediados por ação celular que permitem resistência a certos microrganismos patogênicos. Possuem também fatores antimicrobianos (péptidos, fosfatases ácidas, lisozimas) e várias vias de sinalização, incluindo propenoxidase (proPO) e cascatas proteolítica. A hemolinfa contém hemócitos que apresentam um papel fundamental com capacidade de fagocitar, encapsular e destruir partículas estranhas (Le Pabic *et al.*, 2014, Gestal e Castellanos-Martínez, 2015, Antunes *et al.*, 2010).

Apesar da sua patogenicidade, alguns estudos têm demonstrado que algumas espécies da família *Vibrionaceae* podem desempenhar um papel importante nos seus hospedeiros. Assim por exemplo, Zhao *et al.*, (2012) ao estudarem a microbiota no intestino do abalone (*Haliotis diversicolor*) confirmaram que certas espécies de *Vibrionaceae* podem degradar polissacarídeos variados e afetar favoravelmente a microbiota intestinal, estimulando a atividade digestiva.

A análise taxonômica mostrou que as amostras da hemolinfa e do trato digestivo, apresentaram grupos específicos. Na hemolinfa por exemplo foram encontrados os seguintes grupos: i) *Pseudoalteromonadaceae*, previamente associados à atividade antimicrobiana e um valor bioativo associado à secreção de compostos extracelulares nos bivalves, e têm um impacto na sobrevivência dos hemócitos (Defer *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2012; Desric *et al.*, 2013) e já foram identificadas nas ostras (Nathalie, 2015); ii) *Shewanellaceae* foram incluídos como probióticos na aquacultura (Iehata *et al.*, 2013) e com função antimicrobiana (Grigioni *et al.*, 2000); iii) *Comamonadaceae*, família associada à degradação de moléculas orgânicas, como aminoácidos, hidrocarbonetos poliaromáticos e compostos aromáticos (Kormas *et al.*, 2014), que podem ser importantes para o metabolismo de moléculas orgânicas complexas e potencialmente tóxicas. A presença destas famílias pode estar relacionada ou ter algum envolvimento nos processos de resposta imunitária.

No trato digestivo, os grupos específicos foram, *Spirochaetaceae* encontradas como microbiota rara no esófago e divertículo, e anteriormente classificadas no microbiota raro nas ostras e com aparente relação com a nutrição (Lokmer e Wegner, 2015,

Lokmer *et al.*, 2016). Apesar dessas diferenças, as *Oxalobacteraceae*, grupo da microbiota rara pertencente a ordem *Burkholderiales* foram encontradas na hemolinfa e em todos os compartimentos do trato digestivo, com exceção do ceco e intestino, acreditando-se ser um dos grupos mais importantes no choco, e *Oceanospirillaceae* foi o segundo grupo da microbiota rara mais destacado, encontrada na hemolinfa, estômago, intestino e esófago, trata-se de um grupo bacteriano que foi associado com a degradação heterotrófica de compostos orgânicos complexos nos invertebrados, com destaque para as poliquetas marinhas (Goffredi *et al.*, 2005).

A estimativa da diversidade determinada com base nos índices de diversidade de Shannon e Simpson recíproco ao nível da família, indicou que a maior diversidade nos compartimentos do trato digestivo foi verificada no esófago, seguindo-se no hepatopâncreas, e a menor diversidade foi detetada no ceco.

O sistema circulatório dos vertebrados pode ser considerado “estéril”, ou seja, sem proliferação de microrganismos em animais saudáveis (Protigieter *et al.*, 2015), Aqui, foram analisadas as amostras de hemolinfa de chocos aparentemente saudáveis. Foi interessante verificar maior diversidade e variabilidade de grupos bacterianos na hemolinfa que nos compartimentos do trato digestivo. A maior diversidade e variabilidade dos grupos bacterianos na hemolinfa, deve estar relacionada com o fato de ser um ambiente rico em nutrientes (Wang *et al.*, 2014) e porque é na hemolinfa onde ocorrem respostas imunológicas e outros processos fisiológicos que podem ser desempenhados por um grupo diversificado de bactérias (Li *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2018; Gestal e Castellanos-Martínez, 2015). Possivelmente, dada alta performance metabólica e do choco, é expectável que a comunidade bacteriana associada à hemolinfa, tenha um papel de fisiológico positivo.

O comportamento alimentar, a ingesta e a própria digestão podem ser afetados por procedimentos experimentais e reequilíbrio do *status* normal pode ser alcançado a velocidades diferentes de individuo a individuo (Ponte *et al.*, 2017). Neste trabalho foi por tanto analisada a diversidade e composição da microbiota dos indivíduos amostrados antes da alimentação. Foi interessante observar a existência de diferentes

padrões de diversidade entre os indivíduos: assim por exemplo o indivíduo 1 apresentaram maior diversidade que o indivíduo 3 onde foi apenas identificada a família *Micoplasmataceae*. Esta falta de sincronia, será avaliada no futuro com um número maior de animais. Nesta primeira aproximação exploratória foi conscientemente utilizada a mínima quantidade possível de animais que permitia utilizar estatística paramétrica. Foi decidido respeitar os números mínimos por grupo experimental em prol do bem-estar animal e a aplicação do princípio das 3Rs.

Esses resultados, mostram que, apesar dos animais serem submetidos as mesmas condições de cultivo, há uma diferença na distribuição dos táxones entre os indivíduos dum mesmo grupo experimental. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente por Fjellheim *et al.*, (2011) quando analisaram a variação inter-individual na microbiota intestinal nas larvas de bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua* L.). A interpretação dos autores foi que as diferenças entre indivíduos estão dependentes de fenómenos estocásticos, ou seja, dependem da chance que favorece as bactérias que estão no lugar certo no momento certo para entrar no habitat e proliferar. No entanto, falta confirmar se esta variabilidade de frequências taxonómicas pode ser explorada num contexto funcional. E ser usado como ferramenta de diagnóstico de status fisiológico. Confirmar, se de alguma maneira, esta variabilidade hemolinfática pode ser indicativo de stress, problemas de bem-estar ou simplesmente pode ser indicador de velocidades metabólicas diferentes entre indivíduos.

Atualmente, algum esforço de investigação tem sido direcionado para a manipulação nutricional e modificação da microbiota do trato digestivo para atender as necessidades nutricionais da aquacultura, tentando manter a robustez e o bem-estar dos animais (Egerton *et al.*, 2018). A maior dificuldade no cultivo em grande escala do choco, tem sido a inexistência de alternativas nutricionais e a aceitação de alimento inerte formulado por parte dos animais. Segundo Zhao *et al.*, (2012) os alimentos formulados não só fornecem nutrientes essenciais para o crescimento e o desenvolvimento dos animais, também se deve alterar o ecossistema microbiano do trato digestivo do organismo hospedeiro, e esta alteração pode ser feita no sentido de favorecer a

microbiota rara (Troussellier *et al.*, 2017). Em termos ecológicos (considerando o intestino como um sistema ecológico) a microbiota rara, pode de alguma maneira funcionar como barreira defensiva contra a instalação de grupos bacterianos puramente patogênicos.

Os resultados da análise da influência da alimentação sobre a microbiota do choco indicaram que os animais amostrados antes da alimentação apresentaram maior diversidade quando comparados com os animais alimentados. Nota-se que, na hemolinfa, alguns grupos foram especificamente encontrados em animais amostrados depois da alimentação especificamente das famílias, *Enterobacteriaceae*, *Alcanivoraceae*, *Moraxellaceae*, esta observação pode indicar que a presença destas famílias forma parte da microbiota transiente, associada a partículas alimentares.

4.2. Conclusão

O presente estudo mostra a primeira caracterização do microbioma associado a regiões discretas do trato digestivo no choco e os resultados revelaram a existência de diversidade específica de grupos bacterianos associado às diferentes regiões. Foi também caracterizado o microbioma na hemolinfa e surpreendentemente revelou-se a presença de grande diversidade bacteriana, maior que qualquer região do trato digestivo.

Em todas as amostras o microbioma fundamental está constituído fundamentalmente pela família *Mycoplasmataceae*. No entanto na hemolinfa onde foi identificada a presença da ordem *Burkholderales*. Apesar de fazerem parte do microbioma raro, as famílias *Oxalobacteraceae* e *Burkholderiaceae* foram grupos encontrados na maior parte das amostras analisadas.

Os resultados da análise individual revelaram a existência de diferenças na composição e diversidade da microbiota entre: i) os indivíduos nos mesmos compartimentos analisados; ii) diferentes compartimentos anatómicos no mesmo indivíduo. Esta informação teria sido perdida no caso de ter feito análise em pools totais do sistema gastrointestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almansa E., Domingues P., Sykes A., Tejera N., Lorenzo A., Andrade JP. (2006). The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Aquaculture*, **256**:403–413.
- Antunes F., Hinzmann M., Lopes-Lima M., Machado J., Martins da Costa P. (2010). Association between environmental microbiota and indigenous bacteria found in hemolymph, extrapallial fluid and mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Microbial Ecology*, **60**:304–309.
- Arkley K, Jacklin MS, Boulter M, Tower J, (1996). The cuttlefish (*Sepia officinalis*): The guide to its exploitation in UK water. *Seafish report* no: SR467:1-81, disponível em <http://www.seafish.org/media/publications/sr467.pdf>
- Austin B. (2006). The Bacterial microflora of fish, Revised. *The Scientific World Journal*, **6**:931–945.
- Baldo L., Riera J.L., Tooming-Klunderud A., Albà M.M., Salzburger W. (2015). Gut microbiota dynamics during dietary shift in eastern african cichlid fishes. *PLoS ONE* **10**:1-23.
- Banerjee G., Ray, .AK. (2016). Bacterial symbiosis in the fish gut and its role in health and metabolism. *Symbiosis*, DOI 10.1007/s13199-016-0441-8.
- Bano N., deRae Smith A., Bennett W., Vasquez L, Hollibaugh J.T. (2007). Dominance of mycoplasma in the guts of the long-jawed mudsucker, *Gillichthys mirabilis*, from five California salt marshes. *Environmental Microbiology*, **9**:2636–2641.
- Barouei J., Moussavi M., Hodgson DM. (2012). Effect of maternal probiotic intervention on HPA axis, immunity and gut microbiota in a rat model of irritable Bowel Syndrome. *PLoS ONE*, **7**:1-13.

- Barratt I., Allcock L. (2012). *Sepia officinalis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012-1.RLTS.T162664A939991.en>
- Bates J. M., Mittge E., Kuhlman J., Baden KN., Cheesman SE., Guillemin K. (2006). Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*, **297**:374–386.
- Bedore C.N., Kajiura S.M., Johnsen S. (2015). Freezing behaviour facilitates bioelectric crypsis in cuttlefish faced with predation risk. *Proceedings of the Royal Society B*: **282**:1-8.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gomez-Llorente C., Gil A. (2012) Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* **61**:160-174.
- Collins A.J, LaBarre B.A., Won B.S.W., Shah M.V., Heng S., Choudhury M.H., Haydar S.A., Santiago J., Nyholma S.V. (2012). Diversity and partitioning of bacterial populations within the accessory nidamental gland of the squid *Euprymna scolopes*. *Applied and Environmental Microbiology*, **12**:4200-4208.
- Cornet V., Henry J., Corre E., Corguill G.L., Zatylny-Gaudin C. (2015). The Toll/NF-κB pathway in cuttlefish symbiotic accessory nidamental gland. *Developmental and Comparative Immunology*, **53**:42-46.
- Davidson S.K. (2017). The squid insurance plan: female *Euprymna scolopes* add potentially protective bacteria to the egg coats of their clutches. *Environmental Microbiology*, **19**:2112–2114.
- Defer D., Desriac F., Henry J., Bourgougnon N., Baudy-Floc'h M., Brillet B., Fleury Y. (2013). Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: The bacterial connection. *Fish & Shellfish Immunology*, **34**:1439–1447.
- Dehler C.E., Secombes C.J., Martin S.A.M. (2017). Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **467**:149–157.

- Dehler CE., Secombes, CJ., Martin SAM. (2017). Seawater transfer alters the intestinal microbiota profiles of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports*, **7**:1-11.
- De la Cruz-Leyva, M.C., Zamudio-Maya M., Corona-Cruz A.I., González-de la Cruz J.U., Rojas-Herrera R. (2011). A method for isolating RNA from metabolically active bacterial flora associated with octopus. *Letters in Applied Microbiology*, **53**:8–13.
- Desriac F., Chevalier P.L., Brillet B., Leguerinel I., Thuillier B., Paillard C. Fleury Y., (2013). Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol*, **350**:107-116.
- Dimitroglou A, Merrifield DL, Carnevali O, Picchiatti S, Avella M, Daniels C, Güroy D, Davies SJ, (2011). Microbial manipulations to improve fish health and production e A Mediterranean perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, **30**:1-16.
- Domingues P.M., Sykes A., Andrade J.P., (2002). The use of *Artemia* sp. or mysids as food source for hatchlings of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.); effects on growth and survival throughout the life cycle. *Aquaculture International*, **9**:319–331.
- Egerton S., Culloty S., Whooley J., Stanton C., Ross R.P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, **9**:1-17.
- Estensoro I., Ballester-Lozano G., Benedito-Palos L., Grammes F., Martos-Sitcha J. A., Mydland L-T., Caldach-Giner J.A., Fuentes J., Karalazos V., Ortiz A., Øverland M., Sitjà-Bobadilla A., Pérez-Sánchez J. (2016). Dietary butyrate helps to restore the intestinal status of a marine teleost (*Sparus aurata*) fed extreme diets low in fish meal and fish oil. *PLoS ONE* 11/2016; 11(11):e0166564., DOI:10.1371/journal.pone.0166564
- Fagutao F.F., Koyama T., Kaizu A., Saito-Taki T., Kondo H., Aoki T., Hirono I. (2009). Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. *FEBS Journal*, **276**:5298–5306.

- FAO. Species Fact Sheets – *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). FAO Fisheries and Aquaculture Department. Disponível em <http://www.fao.org/fishery/species/2711/en>
- Ferreira A., Marquez E.A., Andrade J.P., Lorenzo A., Domingues P.M. (2009). The use of alternative diets to culture juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*: effect on growth and lipid composition. *Aquaculture Nutrition*, **16**: 262-275.
- Fjellheim A.J., Playfoot K.J., Skjermo J., Vadstein O. (2011). Inter-individual variation in the dominant intestinal microbiota of reared Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture Research* **43**:1499-1508.
- Gestal C., Castellanos-Martínez S. (2015). Understanding the cephalopod immune system based on functional and molecular evidence. *Fish & Shellfish Immunology* **46**:120-130.
- Giatsis C., Sipkema D., Ramiro-Garcia J., Bacanu G.M., Abernathy J., Verreth J., Smidt H., Verdegem M. (2016). Probiotic legacy effects on gut microbial assembly in tilapia larvae. *Scientific Reports* **6**:1-11.
- Giatsis C., Sipkema D., Smidt H., Verreth J., Verdegem M. (2014). The colonization dynamics of the gut microbiota in tilapia larvae. *PLoS ONE*, **9**:1-15.
- Givens C.E., Ransom B., Bano N., Hollibaugh J.T. (2015). Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark. *Marine Ecology Progress Series*, **518**:209-223.
- Glöckner F.O., Stal L.J., Sandaa R-A., Gasol J.M., O’Gara F., Hernandez F., Labrenz M., Stoica E., Varela M.M., Bordalo A., Pitta P. (2012). Marine microbial diversity and its role in ecosystem functioning and environmental change. Marine Board Position Paper 17. Calewaert, J.B. and McDonough N. (Eds.). Marine Board-ESF, Ostend, Belgium. Disponível em http://archives.esf.org/fileadmin/Public_documents/Publications/MarineBoard_PP1_microcean.pdf

- Goffredi S.K., Orphan V.J., Rouse G.W., Jahnke L., Embaye T., Turk K., Vrijenhoek, R.C. (2005). Evolutionary innovation: a bone-eating marine symbiosis. *Environmental Microbiology*, **7**:1369-1378.
- Green T.J, Barnes A.C. (2010). Bacterial diversity of the digestive gland of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* infected with the paramyxean parasite, *Marteilia sydneyi*. *Journal of Applied Microbiology*, **109**: 613–622.
- Grigioni, S., Boucher-Rodoni, R., Demarta, A., Tonolla, M., Peduzzi, R. (2000). Phylogenetic characterisation of bacterial symbionts in the accessory nidamental glands of the sepioid *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Decapoda). *Marine Biology*, **136**:217–222.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**:95-98.
- Huson DH, (2018). MEGAN Community Edition - Interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. *PLoS Computational Biology* **12**:1-12
- Huson D.H, Beier S., Flade I., Górska A., El-Hadidi M., Mitra S., Ruscheweyh H-J., Tappu R. (2016). MEGAN community edition – interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing Data. *PLoS Comput Biol* **12**: e1004957.
- Iehata S., Valenzuela F., Riquelme C. (2013). Analysis of bacterial community and bacterial nutritional enzyme activity associated with the digestive tract of wild Chilean octopus (*Octopus mimus*, Gould, 1852). *Aquaculture research*, pp.1-13.
- Jovel J., Patterson J., Wang W., Hotte N., O’Keefe S., Mitchel T., Wong G.K.S. (2016). Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, **7**:1-17.
- Kellogg C.A., Lisle J.T., Galkiewicz J.P. (2009). Culture-independent characterization of bacterial communities associated with the cold-water coral *Lophelia pertusa* in the northeastern Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**:2294–2303.

- Karasov W.H., del Rio C.M. Caviedes-Vidal E. (2011). Ecological physiology of diet and digestive systems. *The Annual Review of Physiology*, **73**:69-93.
- King G.M., Judd C., Kuske C.R. Smith C. (2012) Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. *PLoS ONE*, **7**:1-11.
- Kormas K.A., Meziti A., Mente E., Frenzos A. (2014). Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*). *Microbiology Open*, **3**:718–728.
- Koueta N., Boucaud-Camou E., Noel B. (2002). Effect of enriched natural diet on survival and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Aquaculture*, **203**:293-310.
- Kuczynski J., Lauber C.L., Walters W.A., Wegener-Parfrev L., Clemente J.C., Gevers D., Knight R. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome *Nature Reviews Genetics* **13**: 47–58
- Lamarre S.G., MacCormack T.J., Sykes A.V., Hall JR., Speers-Roesch B., Callaghan N.I., Driedzic W.R. (2016). Metabolic rate and rates of protein turnover in food-deprived cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758). *American Journal of Physiology-Regulatory. Integrative and Comparative Physiology*, **310**:1160–1168.
- Le Pabic C., Goux D., Guillamin M., Safi G., Lebel J-M., Koueta N., Serpentine, A. (2014). Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Fish & Shellfish Immunology*, **40**:362-373.
- Levy M., Blacher E., Elinav E. (2017). Microbiome, metabolites and host immunity. *Current Opinion in Microbiology* **35**:8-15.
- Li S., Sun L., Wu H., Hu Z., Liu W., Li Y., Wen X. (2012). The intestinal microbial diversity in mud crab (*Scylla paramamosain*) as determined by PCR-DGGE and clone library analysis. *Applied Microbiology*, **113**:1341-1351.

- Lokmer A., Goedknecht M.A., Thielges D.W., Fiorentino D., Kuenzel S., Baines J.F., Wegner K.M. (2016). Spatial and temporal dynamics of Pacific oyster hemolymph microbiota across multiple scales. *Frontiers in Microbiology*, **7**:1-18.
- Lokmer A., Wegner K.M. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *International Society for Microbial Ecology*, **9**:670–682.
- Lutz H.L., Ramírez-Puebla S.T., Abbo L., Schlundt C., Sjaarda A.K., Durand A., Hanlon R.T., Gilbert J.A., Welch J.L.M. (2018). A simple microbiome in esophagus and gills of the European common cuttlefish, *Sepia officinalis*. (<https://www.biorxiv.org/content/early/2018/10/11/440677>)
- Martínez-Montaña E., Uriarte I., Rosas C., Amthauer R., Romero A., Farías A. (2017). Replacing live feed with formulated diets in juvenile Patagonian red *Octopus (Enteroctopus megalocyathus)*. *Aquaculture Nutrition*, **00**:1-11.
- Mitra S., Gilbert J.A., Field D., Huson D.H. (2010) Comparison of multiple metagenomes using phylogenetic networks based on ecological indices. *The ISME Journal*, **4**: 1236–1242.
- Nathalie D. (2015). Hemolymph bacterial community of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in response to long-term hypercapnia. In <https://escholarship.org/uc/item/0m06k9rr>.
- Navarrete P., Espejo R.T., Romero J. (2008). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Microbiology Ecology*, **57**:550-561.
- Nayak S.K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, **41**:1553-1573.
- Ni J., Yan Q., Yu Y., Zhang, T. (2013). Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, **87**:704–714.

- Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., Pettersson S. (2012). Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science*, **336**:1262–1267.
- Parker T.F., Haswell W.A. (1972). Textbook of Zoology: Invertebrate. Editor: Marshall AJ & Willian WD, Publisher: Macmillan, 7th Revised edition, ISBN-10: 0333136780 & ISBN-13: 978-0333136782.
- Pérez-Pantoja D., Donoso R., Agulló L., Córdova M., Seeger M., Pieper D.H., González B. (2011). Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environmental Microbiology*, **14**:1091–1117.
- Piazzon M.C., Calduch-Giner J.A., Fouz B., Estensoro I., Simó-Mirabet P., Puyalto M., Karalazos V., Palenzuela O., Sitjà-Bobadilla A., Pérez-Sánchez J. (2017). Under control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome*, **5**:2-23.
- Pichon D., Domart-Coulon I., Boucher-Rodoni R. (2007). Cephalopod bacterial associations: characterization and isolation of the symbiotic complex in the Accessory Nidamental Glands. *Boll. Malacol.*, **43**: 96-102
- Ponte G., Sykes A.V., Cooke G.M., Almansa E., Andrews P.L.R. (2017). The digestive tract of cephalopods: toward non-invasive *in vivo* monitoring of its Physiology. *Frontiers in Physiology*, **8**:1-10.
- Potgieter M., Bester J., Kell DB., Pretorius E. (2015). The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiology Reviews*, **39**:567–591.
- Ramette A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, **62**:142-160.
- Rawls J.F., Mahowald M.A., Ley R.E., Gordon J.I. (2006). Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell*, **127**:423–433.

- Rawls J.F., Samuel B.S., Gordon J.I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *PNAS*, **101**:4596–4601.
- Reid A., Jereb P., Roper, C.F.E. 2005. Family Sepiidae. In: P. Jereb and C.F.E Roper (eds), *Cephalopods of the world. an annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 1. Chambered Nautiluses and Sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae)*, FAO, Rome: 54-152. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/009/a0150e/a0150e00.htm>
- Ringø E., Zhou Z., Vecino J.L.G., Wadsworth S., Romero J., Krogdahl A., Olsen R.E., Dimitroglou A., Foey A., Davies S., Owen M., Lauzon H.L., Martinsen L.L., De Schryver P., Bossier P., Sperstad S., Merrifield D.L., (2016). Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? *Aquaculture Nutrition*, **22**:219-282.
- Romero J., Ringø E., Merrifield D.L. (2014). The gut microbiota of fish. *Aquaculture Nutrition: GutHealth, Probiotics and Prebiotics*, First Edition:75-100.
- Romero J., Navarrete P. (2006). 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology*, **51**:422–430.
- Roeselers G., Mittge EK., Stephens WZ., Parichy D.M., Cavanaugh C.M., Guillemin K., Rawls JF. (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal*, **5**:1595–1608.
- Roura Á., Doyle S.R., Nande M., Strugnell J.M. (2017). You are what you eat: A genomic analysis of the gut microbiome of captive and wild *Octopus vulgaris* paralarvae and their zooplankton prey. *Frontiers in Physiology*, **8**:362.
- Safi G., Martinez A.S., Le Pabic C., Le Bihan E., Robin J.P., Koueta, N. (2017). Digestive enzyme ratios are good indicators of hatchling yolk reserve and digestive gland maturation in early life stages of cuttlefish *Sepia officinalis* L.: application of

- these new tools in ecology and aquaculture. *Journal of Comparative Physiology B*, **188**:57–76.
- Smith C.C., Snowberg L.K., Gregory Caporaso J., Knight R., Bolnick D.I. (2015). Dietary input of microbes and host genetic variation shape among-population differences in stickleback gut microbiota. *The ISME Journal*, **9**:2515–2526.
- Speers-Roesch B., Callaghan N.I., MacCormack T.J., Lamarre S.G., Sykes A.V., Driedzic W.R. (2016). Enzymatic capacities of metabolic fuel use in cuttlefish (*Sepia officinalis*) and responses to food deprivation: insight into the metabolic organization and starvation survival strategy of cephalopods. *Comp Biochem Physiol B*, **186**:711–725.
- Sykes A.V., Gonçalves R.A., Andrade J.P. (2013). Early weaning of cuttlefish (*Sepia officinalis*, L.) with frozen grass shrimp (*Palaemonetes varians*) from the first day after hatching. *Aquaculture Research*, **44**:1815–1823.
- Sykes A.V., Almansa E., Cooke G.M., Ponte G., Andrews P.L.R. (2017). The Digestive Tract of Cephalopods: A neglected topic of relevance to animal welfare in the laboratory and aquaculture. *Frontiers in Physiology*, **8**:492.
- Tanaka R., Ootsubo M., Sawabe T., Ezura Y., Tajima K. (2004) Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. *Aquaculture*, **241**:453–463.
- Troussellier M., Escalas A., Bouvier T., Mouillot D. (2017). Sustaining rare marine microorganisms: macroorganisms as repositories and dispersal agents of microbial diversity. *Frontiers in Microbiology*, **8**:1-17.
- Vidal E.A.G, Villanueva R., Andrade J.P., Gleadall I.G., Iglesias J., Koueta N., Rosas C., Segawa S., Grasse B., Franco-Santos R.M., Albertin C.B., Caamal-Monsreal C., Chimal M.E., Edsinger-Gonzales E., Gallardo P., Le Pabic C., Pascual C., Roumbedakis K., Wood J. (2014). Cephalopod culture: current status of main biological models and research priorities. *Advances in Marine Biology*, **67**:1-98.

- Yang B., Wang Y., Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, **17**:1-8.
- Wang X.-W., Wang, J.-X. (2015). Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. *Molecular Immunology*, **68**:404–411.
- Wang A.R., Ran C., Ringø E., Zhou Z.G. (2017). Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, **10**:626–640.
- Wang X.-W., Xu J.-D., Zhao X.-F., Vasta GR., Wang J.-X. (2014). A Shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 289:11779–11790.
- Wong S., Rawls J.F. (2012). Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. *Molecular Ecology*, **21**:3100-3102.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Computational Biology*, **7**:203-14.
- Zhang X., Sun Z., Zhang X., Zhang M., Li S. (2018). New cell extraction method reveals hemolymph microbiome of three aquatic invertebrates. *Appl. Environ. Microbiol* doi:10.1128/AEM.02824-17.
- Zhao J., Shi B., Jiang Q., Ke C. (2012). Changes in gut-associated flora and bacterial digestive enzymes during the development stages of abalone (*Haliotis diversicolor*). *Aquaculture*, **338-341**:147–153.