

Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Impacto fisiológico do parasita dinoflagelado  
*Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) em corvina-  
legítima (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) produzida em  
aquacultura

Ana Filipa de Vasconcelos Nogueira

Nº 48827

2015

Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Impacto fisiológico do parasita dinoflagelado  
*Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) em corvina-  
legítima (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) produzida em  
aquacultura

Ana Filipa de Vasconcelos Nogueira

Nº 48827

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha

Orientação realizada por:

Doutora Florbela Soares (IPMA)

Prof. Cat. Doutor José Pedro Andrade (FCT-UAlg)

**Impacto fisiológico do parasita dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) em corvina-legítima (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) produzida em aquacultura**

Declaração de autoria de trabalho

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

---

**Copyright© Ana Filipa de Vasconcelos Nogueira, N° 48827**

**Faculdade de Ciência e Tecnologia - Universidade do Algarve**

*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 em 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.*

“A melhor maneira de respeitar um autor é fazer alguma coisa com o que ele fez. Eu adorava que fizessem alguma coisa com o que fiz. Respeitar é continuar, como se fosse um diálogo, uma conversa.”

Gonçalo M. Tavares

“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent that survives.

It is the one that is the most adaptable to change.”

Charles Darwin

*Dedico esta dissertação:*

*À minha avó*

## **Agradecimentos**

Na meta final de uma tese de mestrado ficam sempre mil obrigadas a entregar a todos os que fizeram deste objetivo algo concretizável pelas mais variadas razões.

### Agradeço por isso:

À Doutora Florbela Soares por ter aceitado coordenar-me nesta tese e pelo tanto que me ensinou e proporcionou. Por todos os conselhos e pelas revisões de última hora. Ao Professor Cat. Doutor José Pedro Andrade por ter aceitado fazer parte deste projeto. Sem a vossa orientação não teria sido possível.

Ao Doutor Pedro Pousão-Ferreira por me ter permitido realizar esta tese nas instalações da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão.

Um sincero obrigada à equipa fantástica com quem tenho o privilégio de trabalhar e conviver. Obrigada em particular à Ana Margarida Gamboa, ao Márcio Moreira, à Ana Medeiros, à Marisa Barata, ao Ravi Luna e à Teresa Gomes pela preciosa e fundamental ajuda na hora da amostragem. Obrigada à Doutora Laura Ribeiro, por todos os ensinamentos que partilhou comigo.

Ao projeto 0433\_BONAQUA\_5\_E POCTEP 2007-2013 (Operational Programme for Cross-border Cooperation between Spain and Portugal) co-financiado pelos Fundos Europeus para o Desenvolvimento Regional, União Europeia (FEDER, UE).

Ao projeto PROMAR\_AQUACOR\_31-03-05FEP-003 - Projeto-piloto de cultivo de corvina em vários sistemas de produção.

Agradeço ainda ao Dr. Benjamin Costas, do CIIMAR, pela partilha de material teórico, que amparou a realização de algumas análises.

Um obrigada enorme a todos os que me ouviram durante dois anos a falar de peixes, parasitas e doenças: Sara, Sofia, Ratinho, Ana, Thiago, João, Miguel, Luís, Verónica e Naíde. Vocês são o melhor do Algarve.

A vocês que apesar de morarem a mais de 600km de mim, sempre foram amigos excepcionais e me incentivaram, sempre mostraram interesse e, mais que isso, sempre me “obrigaram” a querer saber mais para vos poder explicar.

Agradeço ainda à minha família por tudo o que sou, por tudo o que sei e por tudo o que tenho. Sem vocês não conseguiria nunca chegar aqui.

Avô, como já disse um dia, só homens como tu valem a pena. Obrigada pelo tanto que me ensinas, pelo que me transmites, pelos elogios, pelo colo.

Avó, obrigada por seres um exemplo de força e dedicação. O primeiro passo demo-lo de mãos dadas, em 1996, mas já antes tínhamos começado a estratégia em cadernos de linhas duplas sentadas na mesa da cozinha.

Pai, obrigada por acreditares que eu era capaz, por me teres dado a ilusão que sozinha eu conseguia levar o mundo à frente, por me teres amparado nos tropeços e mais ainda por me teres permitido ser o que eu quisesse, onde quisesse.

Mãe, obrigada mais ainda por saberes que eu era capaz, por tudo o que abdicaste por mim, por tudo o que lutaste por mim, por te importares e queres sempre aprender mais também. Tenho a certeza que esta curiosidade e vontade “de mais” herdei de ti. Obrigada pelos bons genes, não tem preço.

Mariana, obrigada por seres a melhor irmã do mundo, por seres um exemplo de bondade e alegria.

A ti, por quem eu vou sempre querer ser mais e melhor.

Obrigada a todos os que de uma forma ou de outra percorreram este caminho comigo. Esta tese é tão minha quanto vossa.

## Resumo

A produção de peixe em aquacultura apareceu como resposta a uma sobre-exploração dos recursos marinhos. Visando aumentar a diversidade deste novo recurso, novas espécies foram introduzidas no sistema de cultivo de peixe, entre elas, a corvina-legítima (*Argyrosomus regius*). No entanto, a introdução de novas espécies foi acompanhada por uma série de problemas patológicos. O dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* é um dos parasitas que mais causa problemas às culturas, sendo responsável por grandes mortalidades e por vezes põe em causa toda a produção. Neste trabalho foram analisados os impactos fisiológicos causados por *A. ocellatum* à corvina-legítima. Na presença do parasita o sistema hematológico, foi afetado, existindo uma resposta imunológica associada a esta invasão, mostrando uma tentativa de resistência ao parasita, por parte do peixe. Histologicamente, o epitélio respiratório das brânquias foi o mais afetado, sofrendo hiperplasia e fusão lamelar, assim como aneurismas e posteriores hemorragias. O baço reagiu com uma maior produção de macrófagos, que despoletaram uma resposta fagocitária ao invasor. Neste trabalho, pretendemos avaliar a influência do parasita *A. ocellatum* na fisiologia de *A. regius* e encontrar respostas que nos permitam entender de melhor forma possível abordagens na sua prevenção e tratamento, criando melhores condições de produção para esta espécie.

**Palavras-chave:** Aquacultura, patologia, ectoparasita, dinoflagelado, *Amyloodinium ocellatum*, *Argyrosomus regius*, hematologia, imunologia, histologia

## **Abstract**

The production of fish in aquaculture came as a response to an over-exploitation of marine resources. To increase the diversity of this new resource, new species were introduced in the fish farming system, amongst them the meagre (*Argyrosomus regius*). However, the introduction of new species was squired with the appearance of pathologies. The dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* was one of the parasites that caused more problems to the cultures jeopardizing entire farms of fish. In this experimental essay analyzed the physiological impacts caused by *A. ocellatum* in meagre. With the presence of the invasor the hematology system is affected, however, there is immune response of which leads to attempt a resistance against the attack by the parasite. Histologically the respiratory epithelium of the gills is the most affected, suffering hyperplasia and lamellar fusion, as well as aneurysms and subsequent hemorrhages. The spleen reacts with greater production of phagocytic macrophages that triggers one response to the invasor. In this thesis we intend to evaluate the influence of the parasite *A. ocellatum* in the physiology of *A. regius* and obtain responses that help us to understand the best manners to prevent and treat, creating this ways better conditions for the production of *A. regius*.

**Key-words:** Aquaculture, pathology ectoparasite, dinoflagellate, *Amyloodinium ocellatum*, *Argyrosomus regius*, hematology, immunology, histology

## Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aquacultura: uma visão geral.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Parasitismo, doenças nos peixes em cativeiro.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Amyloodiniose em <i>Argyrosomus regius</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Objectivos.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Desenho experimental.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Análise de parâmetros hematológicos .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1 Colheita de sangue .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.2 Hematócrito.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.3 Contagem e identificação de células sanguíneas.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.4 Hemoglobina (hgb) .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Análise de parâmetros imunológicos e de stress.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.1 Comportamento.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2 Lisozima.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.3 Glucose .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.4 Cortisol .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Análise de parâmetros histológicos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Análise estatística .....</b>	<b>21</b>
<b>3. Resultados .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Parâmetros hematológicos.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1 Hematócrito.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2 Eritrócitos, leucócitos, índice de condição (IC) do peixe e Índice somático do baço (SSI - Splenic Somatic Index).....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.3 Contagem e identificação de células sanguíneas.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.4 Hemoglobina .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Parâmetros imunológicos e de stress .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.1 Comportamento.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2 Lisozima .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3 Glucose .....</b>	<b>30</b>

<b>3.2.4</b>	<b>Cortisol .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3</b>	<b>Parâmetros histológicos .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Histologia das brânquias.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Histologia do baço.....</b>	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>45</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Mapa da distribuição da corvina-legítima <i>Argyrosomus regius</i> (www.aquamaps.org) .....	4
Figura 2 - Ilustração do ciclo de vida do parasita dinoflagelado <i>Amyloodinium ocellatum</i> (Soares et al., 2011).....	8
Figura 3 – Tanque de 600 L utilizado para infecção de <i>Amyloodinium ocellatum</i> (EPPO).....	12
Figura 4 – Transporte de <i>Argyrosomus regius</i> dos tanques para o local de amostragem com anestesia 2-fenoxietanol .....	13
Figura 5 – Amostragem morfométrica de <i>Argyrosomus regius</i> .....	14
Figura 6 – Colheita de sangue de <i>Argyrosomus regius</i> através de punção da veia caudal.....	15
Figura 7 - Relação entre a percentagem de eritrócitos do sangue de <i>Argyrosomus regius</i> no tanque controlo e no tanque de infecção por <i>Amyloodinium ocellatum</i> ao longo do período de ensaio. Letras diferentes a e b significam diferenças estatísticas $p \leq 0,05$ . .....	23
Figura 8 - Relação percentual entre eritrócitos e leucócitos de <i>Argyrosomus regius</i> nos diferentes tratamentos.....	24
Figura 9 – Relação entre a percentagem dos eritrócitos de <i>Argyrosomus regius</i> comparativamente com o índice somático do baço .....	24
Figura 10- Leucócitos no sangue de <i>Argyrosomus regius</i> no início do ensaio (M- Monócitos; T- Trombócitos; N- Neutrófilos; B- Basófilos; L- Linfócitos e Eo- Eosinófilos) .....	26
Figura 11 - Leucócitos no sangue de <i>Argyrosomus regius</i> do tanque controlo e do tanque de infecção por <i>Amyloodinium ocellatum</i> 4 horas após o início do ensaio (M- Monócitos; T- Trombócitos; N- Neutrófilos; B- Basófilos; L- Linfócitos e Eo- Eosinófilos).....	26
Figura 12 - Leucócitos no sangue de <i>Argyrosomus regius</i> do tanque controlo e do tanque de Infecção por <i>Amyloodinium ocellatum</i> 24 horas depois do início do	

ensaio (M- Monócitos; T- Trombócitos; N- Neutrófilos; B- Basófilos; L- Linfócitos e Eo- Eosinófilos) .....	27
Figura 13 - Leucócitos no sangue de <i>Argyrosomus regius</i> do tanque controlo e do tanque de Infecção por <i>Amyloodinium ocellatum</i> 30 horas depois do início do ensaio (M- Monócitos; T- Trombócitos; N- Neutrófilos; B- Basófilos; L- Linfócitos e Eo- Eosinófilos) .....	27
Figura 14 - Determinação quantitativa da de hgb em <i>Argyrosomus regius</i> nos tanques controlo e infectado por <i>Amyloodinium ocellatum</i> (g.l-1/h) Letras diferentes a e b indicam diferenças significativas entre os tratamentos $p \leq 0,05$ ...	28
Figura 15- Concentração de lisozima em <i>Argyrosomus regius</i> nos tanques controlo e infectado por <i>Amyloodinium ocellatum</i> . Letras diferentes a e b indicam diferenças significativas entre tratamentos .....	29
Figura 16- Concentração de glucose em <i>Argyrosomus regius</i> nos tanques controlo e infectado por <i>Amyloodinium ocellatum</i> .....	30
Figura 17 – Concentração de cortisol em <i>Argyrosomus regius</i> nos tanques controlo e infectado por <i>Amyloodinium ocellatum</i> .....	31
Figura 18 – Imagens de cortes histológicos de brânquias de <i>Argyrosomus regius</i> aquando infecção por <i>Amyloodinium ocellatum</i> (A) Brânquia T0 com ampliação de 400x (B) Brânquia T0 com ampliação de 1000x (C) Brânquia T4 com ampliação de 400x (D) Brânquia T4 com ampliação de 1000x (Tanque de Infecção).....	33
Figura 19 – Imagens de cortes histológicos de brânquias de <i>Argyrosomus regius</i> aquando infecção por <i>Amyloodinium ocellatum</i> (E) Brânquia T24 com ampliação de 400x (F) Brânquia T24 com ampliação de 1000x (G) Brânquia T30 com ampliação de 400x (H) Brânquia T30 com ampliação de (Tanque de Infecção).....	34
Figura 20 - Imagens de cortes histológicos de baços de <i>Argyrosomus regius</i> aquando infecção por <i>Amyloodinium ocellatum</i> (I) Baço T0 com ampliação de 100x (J) Baço T0 com ampliação de 1000x (K) Baço T30 com ampliação de 100x (L) Baço T30 com ampliação de 1000x (Tanque de Infecção) .....	35

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Produção e utilização mundial das Pescas e Aquacultura (Fonte: FAO, 2014).....	3
Tabela 1.2 – Índice de condição (IC) de <i>Argyrosomus regius</i> nos diferentes tempos e tratamentos .....	25
Tabela 1.3 - Percentagem de eritrócitos de <i>Argyrosomus regius</i> na contagem e identificação de células sanguíneas .....	25

## **1. Introdução**

## **1.1 Aquacultura: uma visão geral**

A exploração da indústria pesqueira tem sido uma das principais fontes de recursos alimentares do Homem, contribuindo para que o consumo de pescado tenha vindo a atingir, ao longo dos anos, valores bastante elevados (FAO, 2014). Vários estudos revelam a importância do consumo de peixe, sendo esta a única fonte conhecida de ácidos gordos polissaturados ómega-3, muito importante e saudável para a dieta humana, por ser responsável por um equilíbrio proteico e por ser uma fonte substituta à proteína da carne (Tidwell & Allan, 2012). Economicamente o consumo de peixe tornou-se, também, mais sustentável, à escala mundial, do que o consumo de carne (Verbeke et al., 2007) tornando-se um componente nutricional chave para países com densidades populacionais elevadas onde os níveis de proteína ingeridos podem ser baixos (FAO, 2014).

No entanto, dados do ano de 2012, revelaram um consumo de, aproximadamente, 136 milhões de toneladas de produtos marinhos (FAO, 2014). O crescimento da população mundial contribuiu para a procura de melhores estratégias que visassem minimizar os riscos de sustentabilidade deste recurso. Existem diversas evidências que as pescas mundiais se encontram em crise, sendo cada vez mais os dados que apontam para um declínio a nível de capturas de pesca (White et al., 2004). Unindo os dois principais fatores de risco, foi necessário encontrar estratégias que minimizassem esse problema, não só em termos biológicos, como também socioeconómicos, de modo a evitar danos maiores nos ecossistemas como a extinção de espécies e as perturbações drásticas nas cadeias tróficas (FAO, 2014).

A produção de peixe em cativeiro veio como resposta a este problema, envolvendo a atividade humana na produção de espécies aquáticas, visando o aumento de indivíduos para além das capacidades das espécies em ambientes naturais (White et al., 2004). Esta atividade tem aumentado desde 2007 cerca de 6% por ano, sendo que de 2011 para 2012 contou com um aumento de cerca de 8%. Dados estimados de 2012 mostraram que a produção mundial de produtos do mar, onde se incluem além do peixe, crustáceos, moluscos e outros animais marinhos, já atingiu valores superiores aos 158 milhões de toneladas num ano e cujo investimento em aquacultura já contribuiu com cerca de 50% do pescado mundial utilizado para a alimentação (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Produção e utilização mundial das Pescas e Aquacultura (Fonte: FAO, 2014)

	2007	2008	2009	2010	2011	2012*
(milhões de toneladas)						
<b>PRODUÇÃO</b>						
<b>Captura</b>						
Continental	10,1	10,3	10,5	11,3	11,1	11,6
Marinha	80,7	79,9	79,6	77,8	82,6	79,7
<b>Total</b>	90,8	90,1	90,1	89,1	93,7	91,3
<b>Aquacultura</b>						
Continental	29,9	32,4	34,3	36,8	38,7	41,9
Marinha	20	20,5	21,4	22,3	24,3	24,7
<b>Total</b>	49,9	52,9	55,7	59	62	66,6
<b>Total de produção mundial</b>	140,7	143,1	145,8	148,1	155,7	158
<b>UTILIZAÇÃO</b>						
Consumo humano	117,3	120,9	123,7	128,2	131,2	136,2
Utilização não alimentar	23,4	22,2	22,1	128,2	24,5	21,7
População (biliões)	6,7	6,8	6,8	6,9	7,0	7,1
Consumo de pescado como alimento per capita (Kg)	17,6	17,9	18,1	18,5	18,7	19,2

Nota: Exclui-se plantas aquáticas. Os totais podem não corresponder devido a arredondamentos.

\*Os dados apresentados para 2012 são estimativas provisórias.

Em Portugal, apesar do sector de produção de alimentos através da aquacultura ainda ser pequeno, relativamente ao resto do Mundo, apresenta valores de expansão ao longo dos anos, principalmente em espécies como a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (FAO, 2014).

Através do crescimento da aquacultura foi necessário, e possível, aumentar o número de estudos que tem vindo a contribuir para aumentar a qualidade do pescado, assim como o aumento do conhecimento quanto à produção de peixes marinhos. Esta necessidade

conduziu a um aumento na competição de várias empresas na produção destas espécies (*S. aurata* e *D. labrax*) em cativeiro que, por excesso de produção, foram conduzidas a uma saturação de mercado e, por conseguinte, a uma redução de preço para o consumidor que começou a tornar a sua criação bastante limitada para o produtor (Rigos & Katharios, 2009).

De forma a garantir a continuidade da produção em aquacultura iniciou-se a introdução de novas espécies marinhas mediterrânicas nos sistemas de produção. Foram o caso de peixes como o sargo-bicudo (*Diplodus puntazzo*), o sargo-legítimo (*Diplodus sargus sargus*), o goraz (*Pagellus bogaraveo*), o pargo (*Pagrus pagrus*), a corvina (*Argyrosomus regius*), a corvina negra (*Sciaena umbra*); o linguado (*Solea senegalensis*), entre outras (Menezes, 2000).

A produção de corvina tem aumentado nos últimos anos em vários países do mediterrâneo. Em Portugal, a produção desta espécie tem suscitado algum interesse dado ao seu rápido crescimento e valor económico.

A. *regius*, é uma espécie da ordem dos Perciformes e da família dos Sciaenidae e apresenta uma ampla distribuição (Figura 1) desde climas temperados a águas costeiras tropicais e, ainda, estuários, que vão desde a Noruega até ao Senegal, incluído o Mar Mediterrâneo e o Mar Preto (Poli et al., 2003).



Figura 1 - Mapa da distribuição da corvina-legítima *Argyrosomus regius* ([www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org))

A corvina foi introduzida recentemente em aquaculturas no sul da Europa, nomeadamente em países como França, Espanha, Itália e Portugal. O método de cultivo utilizado para esta espécie é muito semelhante ao de espécies como o robalo e a dourada, no entanto, ao contrário destas, registos sobre patologias e parasitologias sobre a corvina ainda são muito escassos.

A produção aquícola, apesar de já ter evoluído e aumentado em variedade as espécies, ainda acusa saturação de mercado causada por uma série de problemas patológicos associados às novas espécies introduzidas (Menezes, 2000).

Tornou-se assim imperativo o aumento de estudos na área da patologia, nomeadamente estudos hematológicos, imunológicos e histopatológicos. Estes estudos irão possibilitar a caracterização de quadros de infecção e lesões nos peixes, que podem ajudar a colmatar as lacunas existentes relativamente à saúde dos mesmos. Este tipo de ferramentas também servirá para evitar contaminações e propagação de eventuais agentes infecciosos como bactérias, vírus e parasitas.

## 1.2 Parasitismo, doenças nos peixes em cativeiro

O parasitismo representa um dos maiores sucessos do ciclo de vida apresentado por um organismo vivo, pela forma como este evolui e se sustenta. Consideramos parasitismo qualquer relação em que, entre dois intervenientes, apenas um se aproveita do outro, sendo beneficiado, enquanto o segundo sai prejudicado (Poulin & Morand, 2000).

Sendo os parasitas seres vivos pertencentes ao ecossistema aquático, o perigo que causam e a resposta imunitária que criam no hospedeiro justificam a existência cada vez maior de estudos nesta área, uma vez que, doenças causadas por parasitas, estão entre as principais causas de perdas económicas em aquacultura (Zambrano et al., 2001; Afonso-Dias et al., 2008).

O dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) está entre os ectoparasitas que mais afetam os peixes, e é dos mais conhecidos devido ao número de mortes que já causou, e ainda causa, em diversas comunidades de peixes marinhos, desde peixes de água doce até aquaculturas de águas temperadas (Paperna, 1980; Francis-Floyd & Floyd, 2011; Pereira et al., 2011; Saraiva et al., 2011).

*A. ocellatum* não é específico na sua seleção hospedeira, sendo um agente infeccioso de uma ampla variedade de peixes (Lawler, 1980) sendo dos poucos parasitas que infetam desde teleósteos a elasmobrânquios (Alvarez-Pellitero, 2008). Este parasita unicelular faz parte do grupo oodinoídeos e demonstra uma elevada adaptabilidade causando mortalidade desde ambientes tropicais a ambientes temperados, estando amplamente distribuídos por todo o mundo e alcançando proporções epizooticas em aquário (Noga & Levy, 1995; Zambrano et al., 2001; Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Em aquacultura, o aparecimento de doenças nos peixes de cativeiro é uma consequência de vários fatores relacionados com os métodos de criação e variações das condições ambientais (Landsberg et al., 1994). Na maioria dos casos, qualquer organismo marinho pode atuar como hospedeiro, desde que estejam reunidas as condições ideais (Afonso-Dias, 2008).

Assim sendo, os riscos a que as culturas estão sujeitas necessitam de ser minimizados para evitar perdas económicas elevadas, sendo necessário o desenvolvimento de mecanismos de combate contra esses riscos associados, nomeadamente, infeções (Alvarez-Pellitero, 2008).

Ao longo dos anos, a avaliação hematológica ganhou um papel importante na determinação de distúrbios fisiológicos dos peixes em cativeiro, permitindo a obtenção de informações importantes para o diagnóstico e prognóstico de doenças que afetam as aquaculturas (Tavares-Dias & Moraes, 2007; Fazio et al., 2012).

Os leucócitos e as plaquetas do sangue são variáveis excelentes que ajudam no diagnóstico. Além disso, os índices de glóbulos vermelhos são usados para detectar anemia e também revelar respostas sistêmicas a estímulos externos. Detecção de alterações nos valores do sangue e a capacidade de prever o estado de saúde subsequente de peixe é particularmente importante para o controle de infecções (Tavares-Dias & Moraes, 2007).

Para controlar uma parasitose, o peixe cria uma resposta imunitária. Esta mesma resposta pode ser inata, sendo que provém de uma resposta que o indivíduo consegue de forma natural, sem ajuda externa ou então uma resposta adquirida que o indivíduo consegue dar através de, por exemplo, medicação (Alvarez-Pellitero, 2008).

Apesar do número de mortes em aquacultura apresentar valores bastante elevados, é também verdade, que já se conhece a capacidade de alguns animais conseguirem criarem imunidade contra o parasita. Um estudo realizado por Cobb et al. (1998), cujo objeto de estudo foi o peixe palhaço tomate, *Amphiprion frenatus* demonstrou que esta espécie desenvolveu uma forte imunidade contra uma infecção provocada pelo dinoflagelado *A. ocellatum*. O estudo revelou que a existência de uma partilha de um estado específico de antígeno-anticorpo vai incitando o peixe a criar uma resposta imunitária contra o parasita.

### 1.3 Amyloodinose em *Argyrosomus regius*

A amyloodinose, ou também conhecida por doença aveludada ou de “veludo marinho” ou ainda por “doença dos peixes corais” por tornar a aparência da pele dos peixes aveludada e pela sua preferência por temperaturas mais elevadas, é uma parasitose causada pelo parasita *A. ocellatum* que se encontra já descrito em termos de ciclo de vida, desenvolvimento e morfologia (Landsberg et al., 1994; Francis-Floyd & Floyd, 2011).

O seu ciclo de vida é composto por 3 fases diferentes (Figura 2) sendo considerado um parasita obrigatório que precisa de um peixe para hospedeiro para completar o seu ciclo de vida (Francis-Floyd & Floyd, 2011). A primeira fase, chamada vegetativa ou estacionária, é conhecida como estágio de alimentação é representada por trofontes que penetram as células epiteliais através de rizoides, nomeadamente, brânquias e pele (corpo e barbatanas), causando graves danos locais. De seguida este parasita desenvolve-se para a fase reprodutiva ou encapsulada, onde após a alimentação forma os tomonte que se soltam do peixe caindo para o substrato e, que através de divisão binária onde ocorrem inúmeras e sucessivas divisões celulares se produzem os dinósporos, sendo que cada tomonte é capaz de originar 256 dinósporos (Landsberg et al., 1994; Saraiva et al., 2011; Woo & Ardelli, 2014). Estes fecham o ciclo com a fase dispersativa ou infecciosa, uma vez que nesta fase o parasita se torna ativo, apresentando dois flagelos, ou seja, a morfologia típica dos dinoflagelados (Zambrano et al., 2001; Pereira et al., 2011). Cada dinósporo é um potencial agente infeccioso, uma vez que pode infetar um novo hospedeiro, desenvolver-se em trofonte e reproduzir-se. *A. ocellatum* pode infetar em intervalos de temperatura que vão desde os 16 a 30°C e em intervalos de salinidade que vão desde 10 a 60 psu (Landsberg et al., 1994).

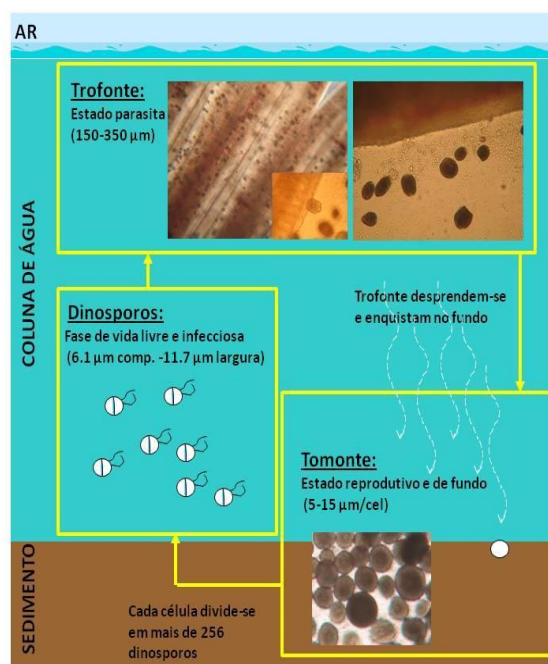


Figura 2 - Ilustração do ciclo de vida do parasita dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* (Soares et al., 2011)

Este parasita é capaz de se reproduzir rapidamente, principalmente em sistemas fechados, levando à morte dos peixes em poucos dias. É usual após ocorrerem grandes mortalidades em aquacultura serem encontrados trofontes nos peixes (Landsberg et al., 1994; Francis-Floyd & Floyd, 2011; Saraiva et al., 2011).

*A. ocellatum* foi identificado em aquaculturas do mediterrâneo em robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Paperna, 1980; Alvarez-Pellitero et al., 1993), onde já causou mortalidades exorbitantes e com elevadas perdas económicas (Soares et al., 2011).

Apesar de atualmente, já estarem desenvolvidas algumas técnicas que através de uma boa gestão e tratamentos podem minimizar o risco de mortalidade causados pelo *A. ocellatum*, (Landsberg et al., 1994) a amyloodinose se não for reconhecida e tratada a tempo, desenvolve-se rapidamente continuando a ser bastante perigosa para a produção aquícola (Francis-Floyd & Floyd, 2011).

Métodos de diagnóstico para este parasita foram desenvolvidos. Métodos histológicos, descritos por Francis-Floyd & Floyd (2011) e Saraiva et al. (2011) foram considerados como preventivos de grandes surtos. Outro método utilizado é um método melhorado para a contagem deste parasitas dinoflagelados já anteriormente utilizado para a contagem de fitoplâncton: o método de Utermöhl (Edler & Elbrächter, 2010). Anteriormente este método padrão exigia uma fixação de 24h a 48h de fixação. Atualmente, este método foi reduzido para 2h a 5h de fixação (Paxinos & Mitchell, 2000) permitindo tanto a identificação como a enumeração dos parasitas, tendo como vantagem a forma como as células se encontram dispersas na câmara de contagem, seguindo uma distribuição de Poisson.

Em Portugal há registos de diagnósticos da doença causada por *A. ocellatum* desde 1994 em dourada (*Sparus aurata*) de aquacultura e em robalo, na lagoa de Óbidos (Menezes, 2000). Em 2000 foi novamente detetado em sistemas de aquacultura causando grandes mortalidades em dourada, robalo, sargo (*Diplodus sargus*), sargo-safia (*Diplodus vulgaris*), sargo-bicudo (*Diplodus puntazzo*) e linguado (*Solea senegalensis*) (Menezes, 2000; Soares et al., 2011). Em 2011 infetou pela primeira vez, em Portugal, *A. regius* em sistema de policultura contaminando também *S. aurata* nos tanques de terra da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (Soares et al., 2012b).

## 1.4 Objectivos

Este trabalho pretende responder a várias questões relacionadas com a causa da morte de corvinas em aquacultura, após a contaminação pelo parasita dinoflagelado *A. ocellatum*.

Para tal, serão efetuados:

Estudos hematológicos, onde se pretende avaliar a influência deste parasita nos componentes sanguíneos, nomeadamente hemoglobina, assim como, na composição das células do sangue.

Estudos imunológicos e de stress, para obter informações relativamente à defesa que o sistema imunitário do peixe exerce face ao invasor assim como análise do stress a que os peixes podem estar sujeitos após a contaminação pelo parasita.

Estudo histopatológicos, para avaliar os danos causados nas brânquias e no baço dos peixes para possibilitar a identificação do grau de transtorno que o parasita causa nos órgãos.

## **2. Material e Métodos**

## 2.1 Desenho experimental

Para a realização deste ensaio, procedeu-se a um desenho experimental que permitisse a infecção por *A. ocellatum* em *A. regius* e, por conseguinte, o registo de comportamento e condições para a colheita de sangue para posteriores análises hematológicas, imunológicas, de stress e histopatológicas.

Inicialmente foi instalado um sistema fechado com dois tanques de 600 L (Figura 3) com água salgada com salinidade de 35 psu. Após o enchimento dos dois tanques procedeu-se à colocação de bio-filtros e de uma resistência com termóstato que permitiu a monitorização de uma temperatura de  $26\pm 1$  °C. Estes encontravam-se devidamente isolados e protegidos com redes e sistemas de desinfecção e esterilização para não haver contaminação com *A. ocellatum* após a infecção dos mesmos. Para tal, foram usados pedilúvios e baldes com lixívia dissolvida para limpeza das mãos, botas e redes.



**Figura 3 – Tanque de 600 L utilizado para infecção de *Amyloodinium ocellatum* (EPPO)**

Após a instalação do sistema, procedeu-se à infecção de um dos tanques com um inóculo de *A. ocellatum* previamente isolado no IPMA. O ensaio realizou-se com uma concentração inicial de 1000 dinósporos por m<sup>3</sup>, que foram diariamente contabilizados através do método de Utermohl (Paxinos & Mitchell, 2000).

Para a realização do ensaio foram transferidos para cada tanque 50 indivíduos de *A. regius* com um peso médio 130g. Os juvenis obtidos eram provenientes de uma mesma postura de reprodutores acondicionados na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO). Antes do ensaio, aproximadamente 24h, os peixes receberam um tratamento com formol no tanque de origem para garantir que no início do ensaio os peixes se encontravam todos isentos de parasitas.

O ensaio decorreu em dois tanques (Tanque Controlo e Tanque de Infecção), durante dois dias nos quais os peixes estiveram em jejum. Foram efetuadas amostragens de 10 indivíduos de cada tanque, nos tempos, 4 horas após infecção (T4), 24 horas após infecção (T24) e 30 horas após infecção (T30). Para efetuar a amostragem os 10 peixes de cada tanque foram previamente anestesiados com 2-fenoxietanol (600ppm) num tanque mais pequeno. Após anestesia foi colhido sangue a cada individuo para futura análise dos parâmetros hematológicos, imunológicos e de stress (Figura 4).



**Figura 4 – Transporte de *Argyrosomus regius* dos tanques para o local de amostragem com anestesia 2-fenoxietanol**

Após colheita de sangue os peixes foram sacrificados com um corte na corda dorsal para recolha de brânquias e baço para análise histológica. Foram determinados, parâmetros morfométricos, comprimento e peso total para cada peixe (Figura 5).



**Figura 5 – Amostragem morfométrica de *Argyrosomus regius***

A temperatura, salinidade, oxigénio dissolvido, número de dinósporos de *A. ocellatum* por m<sup>3</sup> de água foram registados continuamente durante o ensaio apenas para controlo dos valores pretendidos. O comportamento foi observado continuamente durante o ensaio. Foram registados os pesos e comprimentos dos animais, assim como peso e comprimento do baço para posteriores análises de índice de condição do peixe e índice somático do baço.

## 2.2 Análise de parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos analisados foram: hematócrito, contagem e identificação de células sanguíneas e hemoglobina.

### 2.2.1 Colheita de sangue

A colheita de sangue nos peixes seguiu um protocolo de segurança laboratorial que impediu riscos de contaminação, uma vez que foram manuseados peixes parasitados e peixes não parasitados (Figura 6).



Figura 6 – Colheita de sangue de *Argyrosomus regius* através de punção da veia caudal

A colheita do sangue foi efetuada através de punção na veia caudal das corvinas. Estas foram previamente anestesiadas e foram utilizadas agulhas e seringas heparinizadas, sendo colhidas duas porções de sangue colocadas em dois eppendorfs, também heparinizados para estarem aptos a manter o sangue sem coagular para posteriores análises.

Parte do sangue foi utilizado no local para preencher os tubos capilares permitindo posteriormente a análise do hematócrito e a realização das lâminas para contagem e identificação dos eritrócitos e leucócitos.

Do restante sangue um eppendorf foi imediatamente congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da hemoglobina e o outro eppendorf foi centrifugado para obtenção do plasma que, também, foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para análise da lisozima, glucose e cortisol.

### **2.2.2 Hematócrito**

O hematócrito foi realizado no local de amostragem logo após a colheita do sangue. O hematócrito (htc) ou volume globular, VG (em inglês: Packed cell volume, PCV) é uma técnica utilizada para avaliar a quantidade de glóbulos vermelhos ou eritrócitos num dado volume de sangue. O resultado é dado em percentagem de volume globular.

Inicialmente encheu-se o tubo capilar com  $\frac{3}{4}$  de sangue e colocou-se no rotor de hematócrito da centrífuga eba-21 hettich. A centrifugação ocorreu a 10000 rpm durante 5 minutos.

O valor de htc foi determinado pela medição, com auxílio de uma régua, do comprimento total do htc, do comprimento da zona com os glóbulos vermelhos que nos permite avaliar o valor percentual de eritrócitos, do comprimento da zona dos glóbulos brancos que nos permite determinar o valor percentual dos leucócitos que correspondem às células do sistema imunitário e, por conseguinte, do plasma.

### **2.2.3 Contagem e identificação de células sanguíneas**

Para a realização do esfregaço de sangue, colocou-se uma gota de sangue de um lado de uma lâmina. Colocou-se uma outra lâmina em contato com a primeira e com uma inclinação de cerca de 45°. Aguardou-se que o sangue se espalhasse por capilaridade e distendeu-se o sangue com um movimento rápido e uniforme, mantendo as duas lâminas em contato. As lâminas secaram ao ar e foram identificadas. A coloração iniciou-se após as lâminas se encontrarem secas e usando uma solução Giemsa, diluída na proporção de 2 gotas de solução Giemsa para cada ml de solução tampão. Colocou-se o esfregaço num recipiente com solução Giemsa diluída durante 30 minutos. Lavou-se a lâmina em água corrente para retirar o excesso de corante e deixou-se secar ao ar antes da preparação.

Esta técnica permite-nos a observação das células sanguíneas. Para cada lâmina foram selecionados cinco campos aleatórios e a contagem realizada através da observação das lâminas num microscópio óptico, Nikon eclipse Ci e fotografadas numa Nikon DS-L3, sob óleo de imersão a uma ampliação de 1000x.

As células sanguíneas a serem contabilizadas e identificadas foram os linfócitos (L), monócitos (L), eritrócitos (E), trombócitos (T) e granulócitos (G), tendo sido estes diferenciados, quando possível, em neutrófilos (N), eosinófilos (Eo) e basófilos (B).

#### **2.2.4 Hemoglobina (hgb)**

A hemoglobina é uma proteína que contém ferro na sua estrutura, sendo também chamada por metaloproteína. Esta está presente nos eritrócitos e permite o transporte de oxigênio por todo o sistema circulatório. Nos peixes a hemoglobina apresenta uma maior variabilidade de funções estando relacionada tanto com as necessidades fisiológicas como a disponibilidade ambiental de oxigênio. Animais ectotérmicos, como os peixes, tem demonstrado a capacidade de adaptação da hemoglobina a grandes variações e faltas de oxigênio (Smarra et al., 2000).

A concentração de hemoglobina foi determinada através do método de Drabkin. Para a determinação quantitativa de hgb foi utilizado sangue heparinizado que se encontrava armazenado a -80°C e uma solução de trabalho previamente preparada com água destilada e o reagente de Drabkin. A hgb reage, formando um composto – a cianometahemoglobina.

As amostras de hgb foram centrifugadas para remover o material nuclear disperso, e incubadas durante 3 minutos à temperatura ambiente sendo posteriormente determinada a sua absorvância num leitor de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) a 540 nm contra o branco que apenas continha 2,5 ml da solução de trabalho.

## **2.3 Análise de parâmetros imunológicos e de stress**

Os parâmetros imunológicos e de stress analisados foram: comportamento, lisozima, glucose e cortisol.

### **2.3.1 Comportamento**

O comportamento é um dos fatores que pode alterar face à presença de um parasita. A observação dos parâmetros comportamentais foi realizada continuamente durante todo o ensaio. Foram observados os comportamentos natatórios, os comportamentos respiratórios e, ainda, o estado da pele.

### **2.3.2 Lisozima**

A lisozima atua como uma proteína de fase aguda que serve de indicador para a presença de uma infecção, no entanto, pode ser também utilizada como fator de alarme para estados de stress (Demers & Bayne, 2010), assim sendo, tem sido cada vez mais comum a utilização desta enzima como índice de doença/stress nos peixes. A determinação da lisozima (Osserman & Lawlor, 1974) foi realizada através de uma técnica que nos permite através da adição das amostras em estudo a um suspensão bacteriana e, posteriormente, à leitura imediata da sua absorvância nos tempos 0,5 e 4,5 minutos a observação da lise celular bacteriana. Foi utilizado o plasma separado do sangue das corvinas que estava conservado a -80°C.

O método utilizado foi descrito por Costas et al. (2011) e 24h antes da determinação da lisozima as amostras passaram para uma arca a -20°C. Foi utilizada uma solução padrão que continha lisozima de clara de ovo de galinha e tampão hidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Uma solução com *Micrococcus lysodeikticus* foi utilizada como substrato.

Posteriormente, foram realizadas soluções decrescentes de lisozima e colocadas por ordem decrescente em microplacas para a realização da reta padrão. Seguidamente, foi realizada a leitura das amostras.

A diferença de valores entre os dois tempos (0,5min e 4,5min) é o resultado da mesma o que provoca a diminuição do número de bactérias e por conseguinte uma menor absorção. A elaboração de uma reta padrão com quantidades conhecidas de lisozima permite-nos chegar a uma concentração da enzima.

### **2.3.3 Glucose**

A determinação da Glucose foi realizada com o auxílio de um kit Glucosa QCA. A glucose é uma importante fonte de energia e de avaliação do nível de stress. Alterações nos níveis de glucose podem causar consequências negativas nos peixes a nível do metabolismo. A libertação de catecolaminas aumenta uma produção de glucose o que pode desencadear uma série de efeitos secundários a nível dos sistemas respiratórios e cardiovascular uma vez que leva os peixes a uma hiperglicemia. Contudo, uma ausência de catecolaminas provoca uma queda ao nível dos açúcares no sangue que estão relacionados com um nível de stress elevado e fome que podemos observar através de sintomas como fadiga, fome súbita e desorientação.

Para analisarmos o plasma, a solução de glucose presente no kit em cinco concentrações diferentes foi diluída. Após a diluição colocamos as soluções num microplaca para procedermos à leitura da mesma e construirmos a reta padrão.

Numa microplaca foi acrescentado o branco e o padrão em triplicado, as amostras em duplicado e foi também acrescentada a solução de glucose a cada poço. A microplaca foi deixada à temperatura ambiente e lida num leitor de microplacas a uma absorvância igual a 550nm.

### **2.3.4 Cortisol**

O cortisol é uma hormona corticosteróide diretamente envolvida com as respostas imunitárias face ao stress (Pickering & Pottinger, 1983). Um aumento de cortisol estimula a metabolização da glucose no fígado, ou seja consumo de energia.

A determinação da leitura do cortisol presente no plasma dos peixes do ensaio foi realizada através do Kit mini VIDAS© que é um sistema de imuno ensaios automatizado.

## **2.4 Análise de parâmetros histológicos**

O material biológico (brânquias e baço) recolhido para histologia foi inicialmente pesado e medido e posteriormente fixado em formol a 10% tamponado (pH 7,2) durante dois dias. Esta fixação, para além de evitar a destruição das células pelas suas próprias enzimas ou por bactérias, visa também o endurecimento dos tecidos, tornando-os mais resistentes às etapas subsequentes da técnica histológica. Posteriormente o formol foi removido e os tecidos foram conservados em álcool etílico a 70% até serem colocados em cassetes histológicas.

A impregnação dos tecidos nas cassetes de histologia foi realizada após este tratamento com parafina fundida (58-60°C) numa estufa Memmert (Alemanha, RFA) durante 24h.

Foram realizados cortes com 5 µm de espessura, num micrótomo de Corrediça Modelo Leica 5M 2000 R. Esses cortes foram colocados em banho-maria (20°C) e colocados em lâminas de vidro com uma solução de albumina e glicerina. A secagem foi efetuada numa estufa a 58°C, durante pelo menos 30 minutos.

Para a realização do exame histológico, procedeu-se à coloração dos cortes com o corante Hematoxilina-Eosina (H&E), de acordo com o descrito em Martoja & Martoja (1967).

## **2.5 Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão. Os parâmetros hematológicos e imunológicos foram analisados através da análise do Teste F para avaliar a igualdade das variâncias (F-test). Foi utilizada também a análise de variância unidirecional (One-Way ANOVA) e o teste t para duas amostras assumindo a igualdade de variâncias (t-test: two sample assuming equal variance).

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o  $P \leq 0,05$ . Todos os dados foram analisados pelo programa do Microsoft Office Excel 2010®.

### **3. Resultados**

### 3.1 Parâmetros hematológicos

A análise dos parâmetros hematológicos relaciona os dois principais factores deste ensaio, o impacto fisiológico da infecção através do parasita *A. ocellatum* ao longo de um determinado tempo.

#### 3.1.1 Hematócrito

Os resultados obtidos pela análise da percentagem de eritrócitos no total de sangue colhido por indivíduo ao longo do tempo (Figura 7) revelaram que os peixes do tanque de infecção apresentavam sempre valores percentuais inferiores entre os diferentes tratamentos. Peixes do tanque infectado nos tempos: T4 -  $24 \pm 3,1$ ; T24 -  $28 \pm 6,9$  e T30 -  $25 \pm 6,2$  e peixes do tanque controlo nos tempos T4 -  $29 \pm 3,7$ ; T24 -  $28 \pm 2,0$  e T30 -  $28 \pm 4,7$ . Estes apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos T4 dos diferentes tratamentos, assim como entre os tempos T30 dos diferentes tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

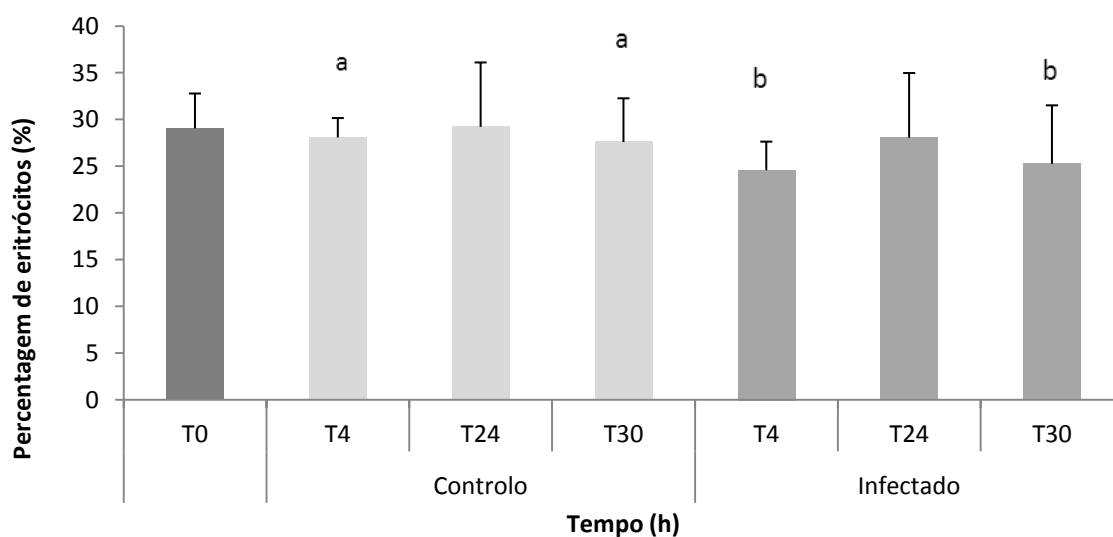


Figura 7 - Relação entre a percentagem de eritrócitos do sangue de *Argyrosomus regius* no tanque controlo e no tanque de infecção por *Amyloodinium ocellatum* ao longo do período de ensaio. Letras diferentes a e b significam diferenças estatísticas  $p \leq 0,05$ .

#### 3.1.2 Eritrócitos, leucócitos, índice de condição (IC) do peixe e Índice somático do baço (SSI - Splenic Somatic Index)

Relacionando a percentagem de leucócitos com a percentagem de eritrócitos (Figura 8) obtida através do htc, foi possível determinar que ocorreu uma diminuição de glóbulos vermelhos no tanque controlo o que não se verificou no tanque de infecção que, pelo

contrário, apresentou valores superiores destes comparativamente com os valores iniciais. No entanto, foi possível observar que a percentagem de glóbulos brancos foi inferior no tanque de infecção aos tempos 4 e 24h do que no tanque controlo. Após 30h do início do ensaio foi observado um aumento de produção de leucócitos.

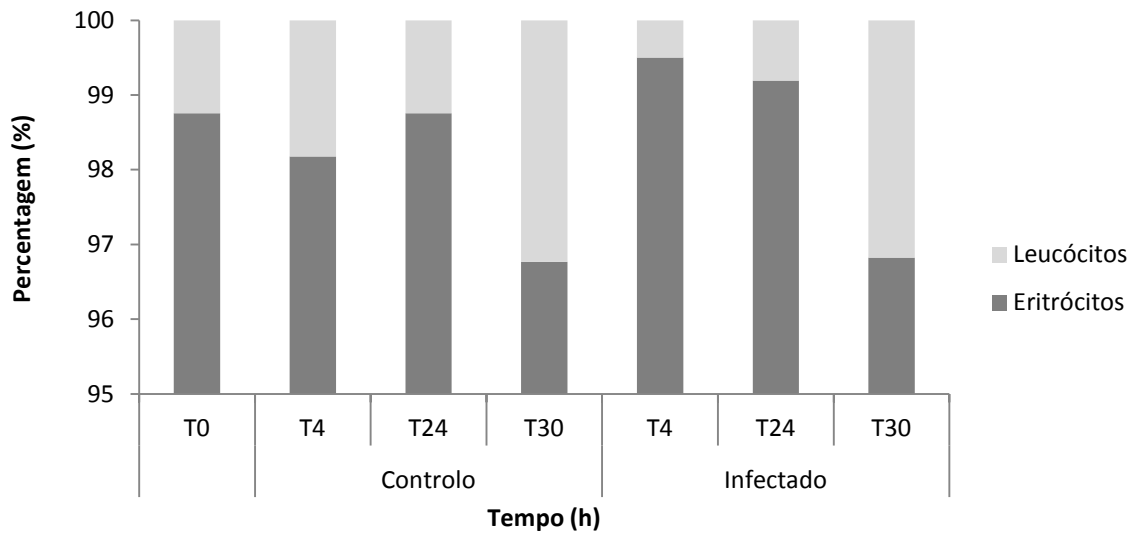


Figura 8 - Relação percentual entre eritrócitos e leucócitos de *Argyrosomus regius* nos diferentes tratamentos

Analisando a Figura 9 foi possível observar que existe uma relação inversa entre a percentagem de eritrócitos e o SSI. Foi observado que quando a percentagem de eritrócitos diminuía o SSI geralmente aumentava.

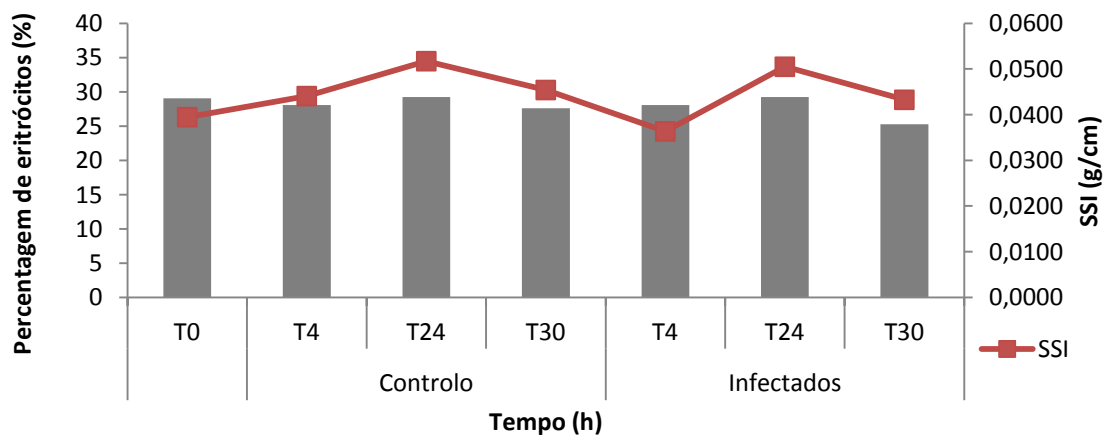


Figura 9 – Relação entre a percentagem dos eritrócitos de *Argyrosomus regius* comparativamente com o índice somático do baço

O índice de condição dos peixes não revelou existirem diferenças significativas no estado de saúde dos peixes encontrando-se dentro dos valores esperados de boa saúde física (Tabela 1.2)

Tabela 1.2 – Índice de condição (IC) de *Argyrosomus regius* nos diferentes tempos e tratamentos

		IC Peixe	
<b>Controlo</b>	<b>T0</b>	0,89	±0,05
	<b>T4</b>	0,91	±0,02
	<b>T24</b>	0,95	±0,10
	<b>T30</b>	0,91	±0,03
<b>Infectados</b>	<b>T4</b>	0,91	±0,00
	<b>T24</b>	0,89	±0,05
	<b>T30</b>	0,96	±0,02

### 3.1.3 Contagem e identificação de células sanguíneas

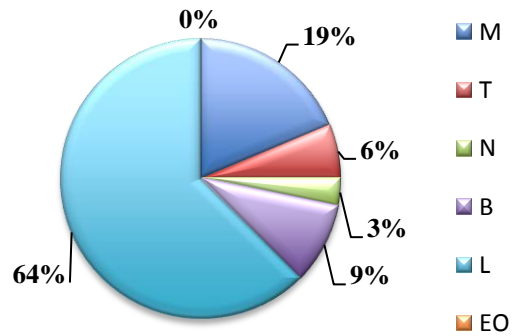
A Tabela 1.3 foi obtida através da contagem e identificação de células sanguíneas em esfregaços de sangue. Os esfregaços mostraram que a percentagem de eritrócitos foi sempre superior à percentagem de leucócitos.

Tabela 1.3 - Percentagem de eritrócitos de *Argyrosomus regius* na contagem e identificação de células sanguíneas

		Eritrócitos (%)	
<b>Controlo</b>	<b>T0</b>	99,54	
	T4	99,66	
	T24	99,63	
	T30	98,87	
<b>Infectado</b>	T4	99,54	
	T24	99,83	
	T30	99,76	

Os leucócitos foram as células que apresentaram uma maior variabilidade quantitativa. Os leucócitos identificados foram os monócitos (M), que têm como principal função a defesa do organismo de corpos estranhos (bactérias, vírus, parasitas entre outros); os trombócitos (T), que têm como principal função a promoção da coagulação sanguínea; os neutrófilos (N), que além de serem os primeiros a atuar em caso de infecção, exercem a função de defesa através da fagocitose; os basófilos (B), que reagem em

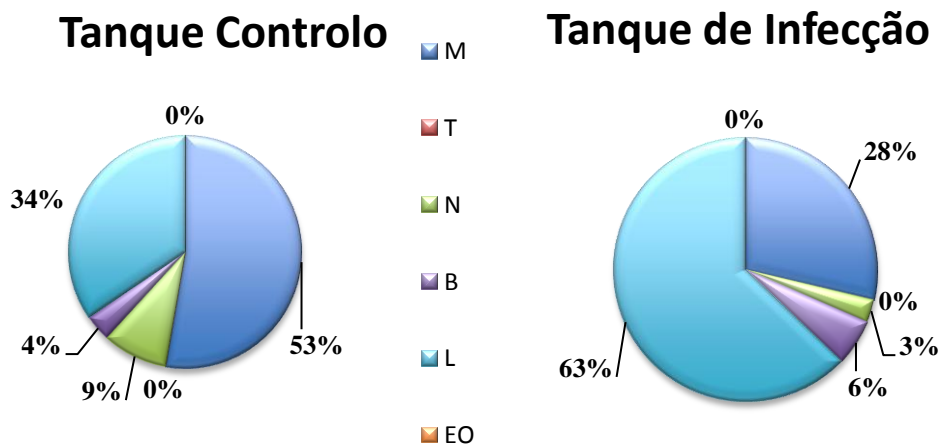
casos de hipersensibilidade imediata, tais como reações alérgicas e os linfócitos (L), responsáveis pela identificação e produção de anticorpos para combater antígenos (corpos estranhos). Os leucócitos do tipo eosinófilo (EO) são células que geralmente atuam na presença na presença de parasitas, destruindo os tecidos do mesmo não foram encontrados em nenhuma lâmina.



**Figura 10- Leucócitos no sangue de *Argyrosomus regius* no início do ensaio (M- Monócitos; T- Trombócitos; N- Neutrófilos; B- Basófilos; L- Linfócitos e Eo- Eosinófilos)**

No início do ensaio (Figura 10), foi possível contabilizar que da quantidade total de leucócitos existiam 64% de linfócitos, 19% de monócitos, 9% de basófilos, 6% de trombócitos e 3% de neutrófilos.

Nas primeiras 4h (Figura 11) não foram encontrados trombócitos nos indivíduos dos dois tanques. Houve um decréscimo significativo dos linfócitos no tanque controlo (34%) que não ocorreu no tanque de infecção e um aumento significativo dos monócitos em ambos os tanques, 53% no tanque controlo e 28% no tanque de infecção.



**Figura 11 - Leucócitos no sangue de *Argyrosomus regius* do tanque controlo e do tanque de infecção por *Amyloodinium ocellatum* 4 horas após o início do ensaio (M- Monócitos; T- Trombócitos; N- Neutrófilos; B- Basófilos; L- Linfócitos e Eo- Eosinófilos)**

A partir das 24h de infecção (Figura 12) foram contabilizados 0% de monócitos no tanque controle e 44% no tanque de infecção. Os linfócitos apresentaram valores de 63% no tanque controle e de 48% no tanque de infecção. Os trombócitos voltaram a aparecer com 2% do valor total de leucócitos no tanque de infecção e 13% no tanque controle. Os neutrófilos apresentaram valores de 25% no tanque controle e 6% no tanque de infecção. Basófilos não ocorreram em ambos os tanques.

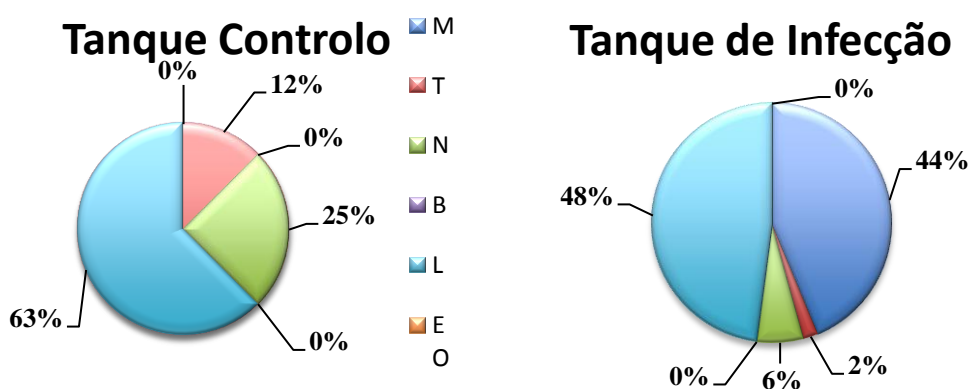


Figura 12 - Leucócitos no sangue de *Argyrosomus regius* do tanque controle e do tanque de Infecção por *Amyloodinium ocellatum* 24 horas depois do início do ensaio (M- Monócitos; T- Trombócitos; N- Neutrófilos; B- Basófilos; L- Linfócitos e Eo- Eosinófilos)

No fim do ensaio (Figura 13) foi observado que os linfócitos apresentavam maior variabilidade em ambos os tanques. No tanque de infecção, foram contabilizados 5% de monócitos, 6% de trombócitos, 11% de neutrófilos e 9% de basófilos.

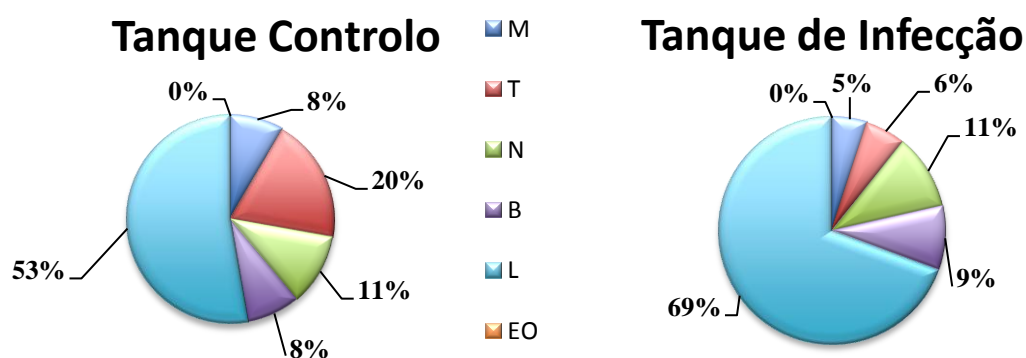
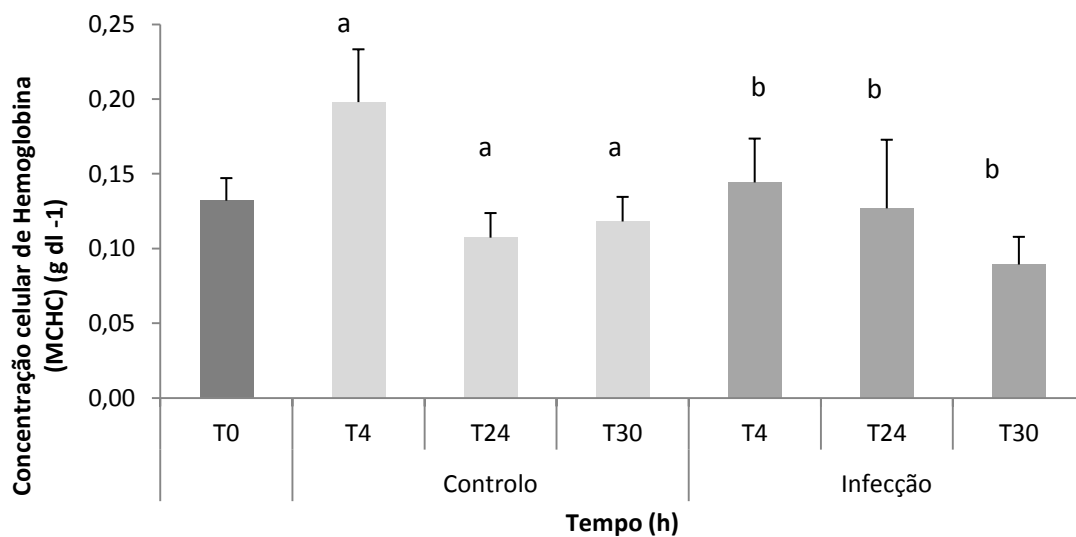


Figura 13 - Leucócitos no sangue de *Argyrosomus regius* do tanque controle e do tanque de Infecção por *Amyloodinium ocellatum* 30 horas depois do início do ensaio (M- Monócitos; T- Trombócitos; N- Neutrófilos; B- Basófilos; L- Linfócitos e Eo- Eosinófilos)

### 3.1.4 Hemoglobina

Foi possível observar através da Figura 14 que os valores de hgb face ao valor inicial subiram nas primeiras 4h de ensaio em ambos os tanques. No entanto, 24h após o início voltaram a atingir valores semelhantes ao inicial. No fim do ensaio, o tanque controle apresentava valores superiores de hgb comparativamente ao tanque de infecção. Estes apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos dos diferentes tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 14 - Determinação quantitativa da de hgb em *Argyrosomus regius* nos tanques controle e infectado por *Amyloodinium ocellatum* (g.l-1/h) Letras diferentes a e b indicam diferenças significativas entre os tratamentos  $p \leq 0,05$**

## 3.2 Parâmetros imunológicos e de stress

### 3.2.1 Comportamento

Foram observados comportamentos de stress e de contaminação por parte de *A. regius* ao longo do ensaio. Os peixes apresentaram movimentos natatórios erráticos nadando de forma mais lenta e confusa, permanecendo perto dos arejadores, assim como da linha de água abrindo mais a boca e as brânquias. Começaram a apresentar manchas avermelhadas na pele assim como feridas.

### 3.2.2 Lisozima

Os resultados obtidos na análise da lisozima (Figura 15) revelaram uma grande variação e um aumento significativo da concentração de lisozima no plasma dos peixes do tanque de infecção face ao tanque controlo. Estes apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos dos diferentes tanques ( $p \leq 0,05$ ).

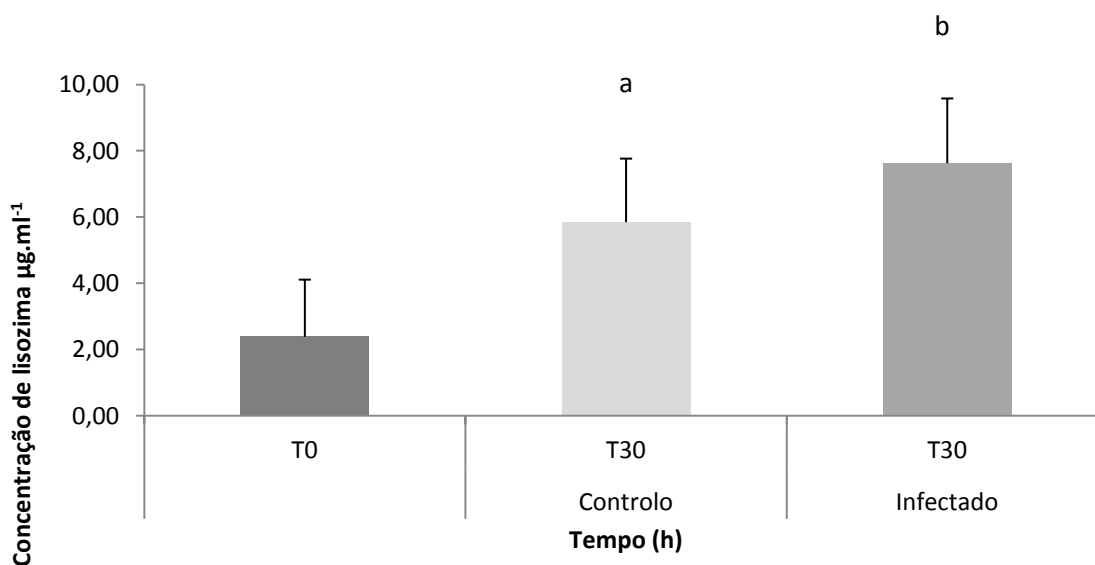


Figura 15- Concentração de lisozima em *Argyrosomus regius* nos tanques controlo e infectado por *Amyloodinium ocellatum*. Letras diferentes a e b indicam diferenças significativas entre tratamentos

### 3.2.3 Glucose

Os resultados obtidos na análise da glucose (Figura 16) mostram que quer no tanque controle quer no tanque de infecção ocorreu uma diminuição da produção de glucose nas 4 primeiras horas do ensaio. Devido à grande variância de valores associados a esta análise não foi possível obter diferenças estatísticas ( $p \geq 0,05$ ), contudo, foi observada uma tendência para a diminuição da produção da glucose no tanque controle que não ocorreu no tanque de infecção.

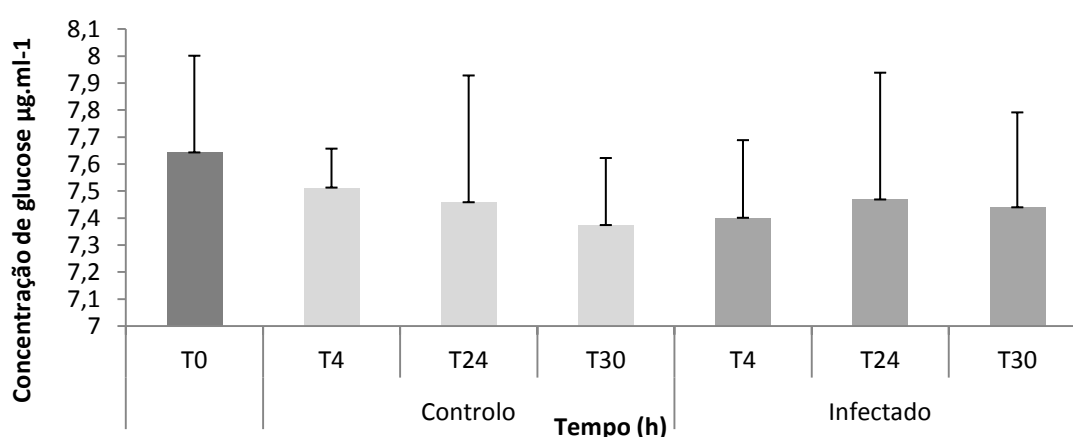
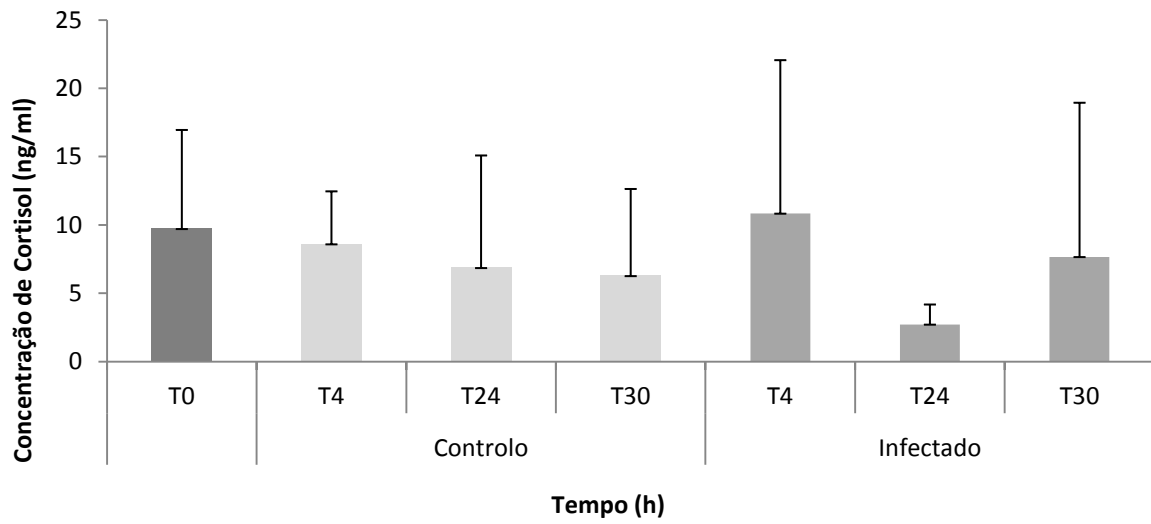


Figura 16- Concentração de glucose em *Argyrosomus regius* nos tanques controle e infectado por *Amyloodinum ocellatum*

### 3.2.4 Cortisol

Os resultados obtidos na análise do cortisol (Figura 17) mostraram que quer no tanque controle quer no tanque de infecção ocorreu um aumento dos níveis de cortisol no início do ensaio. Devido à grande variância de valores associados a esta análise não foi possível obter diferenças estatísticas ( $p \geq 0,05$ ), contudo foi observada uma tendência para a diminuição dos níveis de cortisol no tanque de controle. No tanque de infecção ocorreu diminuição acentuada dos níveis de cortisol às 24h de ensaio e um aumento nas 30h finais.



**Figura 17 – Concentração de cortisol em *Argyrosomus regius* nos tanques controlo e infectado por *Amyloodinium ocellatum***

### **3.3 Parâmetros histológicos**

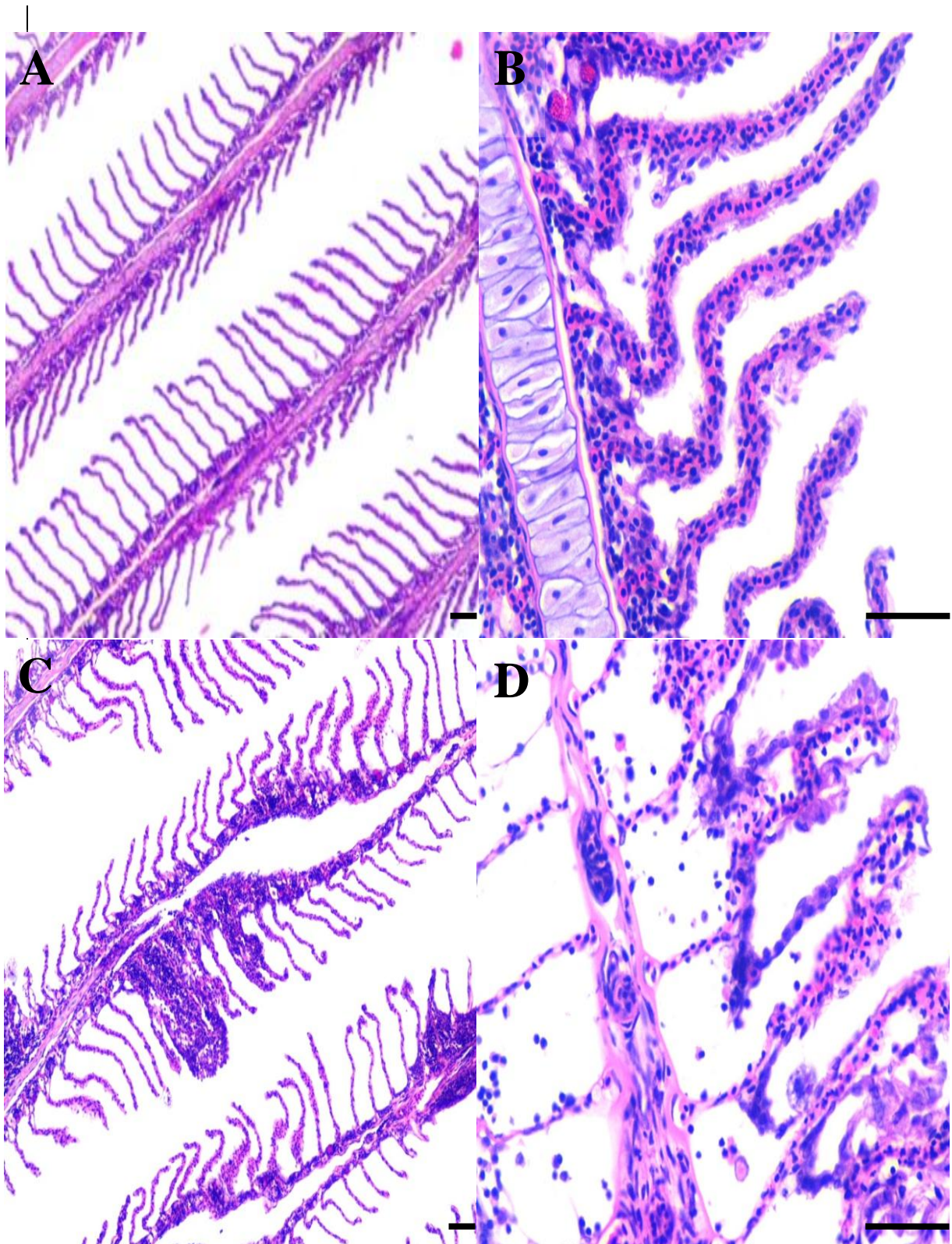
Os parâmetros histológicos analisados foram: o estado do órgão e diferenças nos tecidos face ao estado saudável. Foram analisadas brânquias e baço de peixes do tanque controle e do tanque de infecção. Os peixes do tanque controle não apresentaram diferenças significativas, ao longo do tempo, em ambos os órgãos. O tanque de infecção apresentou diferenças significativas e alterações acentuadas ao nível dos tecidos quer nas brânquias, quer no baço.

#### **3.3.1 Histologia das brânquias**

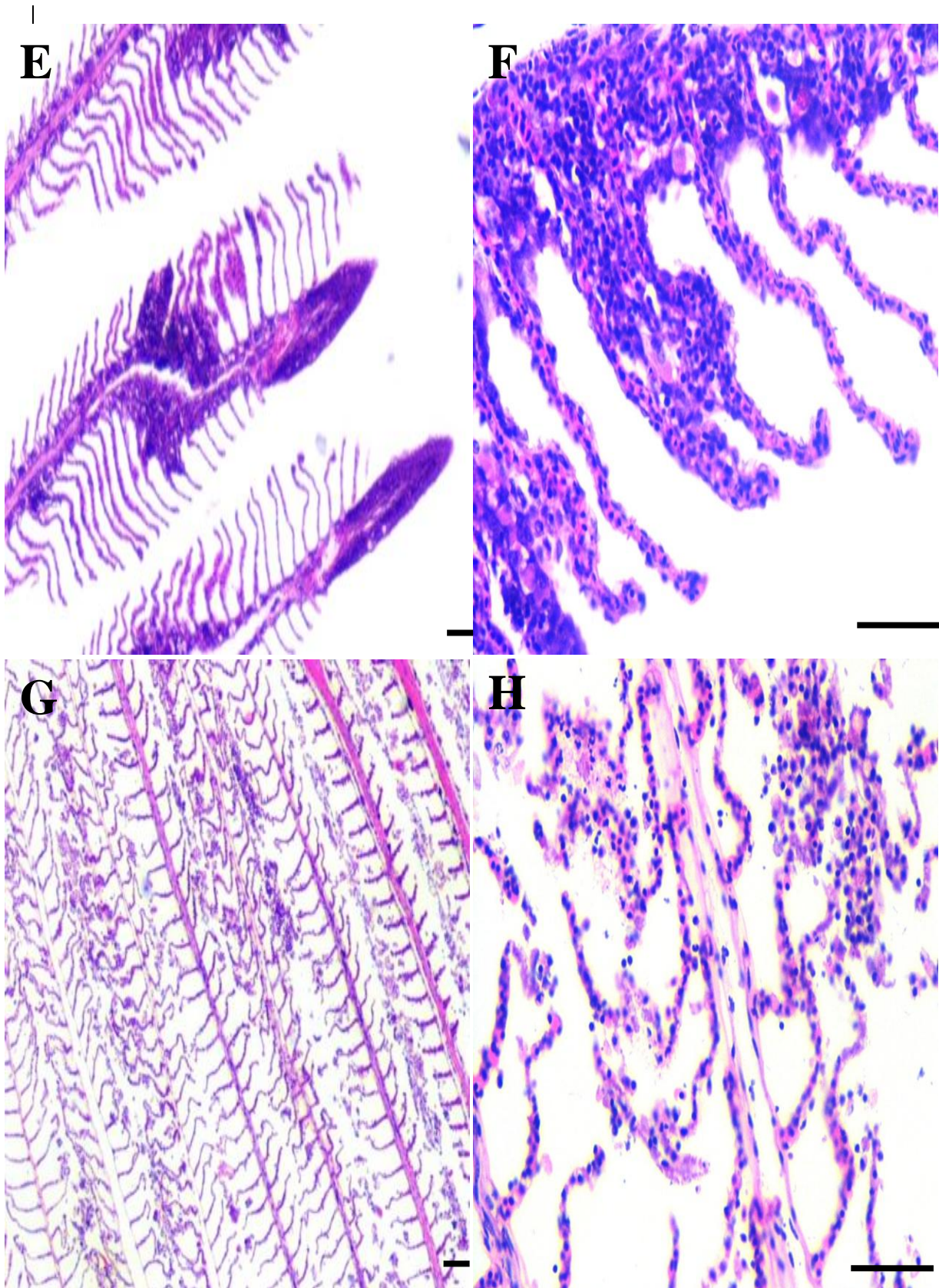
Foi possível observar através das imagens das Figuras 18 e 19 um efeito degenerativo nas brânquias dos peixes no tanque de infecção com o parasita, com o aumento do tempo de infecção.

As brânquias da Figura 18 (A e B) são brânquias de peixes do início do ensaio (T0) e, por tal, apresentam as lamelas separadas (A) e todo o sistema respiratório funcional (B). Ao longo do tempo os indivíduos do tanque de infecção começaram a revelar hiperplasia e fusão lamelar (C) assim como descolamento do epitélio respiratório.

Após 24h de infecção foi possível observar como apresenta a Figura 19 hiperplasia e fusão apical (E) assim como aparecimento de aneurismas. O epitélio respiratório sofreu descolamento total (G) apresentando-se destruído ao fim das 30h de ensaio.



**Figura 18** – Imagens de cortes histológicos de brânquias de *Argyrosomus regius* aquando infecção por *Amyloodinum ocellatum* (A) Brânquia T0 com ampliação de 400x - barra 1mm (B) Brânquia T0 com ampliação de 1000x - barra 1mm (C) Brânquia T4 com ampliação de 400x - barra 1mm (D) Brânquia T4 com ampliação de 1000x - barra 1mm (Tanque de Infecção)



**Figura 19 –** Imagens de cortes histológicos de brânquias de *Argyrosomus regius* aquando infecção por *Amyloodinium ocellatum* (E) Brânquia T24 com ampliação de 400x - barra 1mm (F) Brânquia T24 com ampliação de 1000x - barra 1mm (G) Brânquia T30 com ampliação de 400x - barra 1mm (H) Brânquia T30 com ampliação de 1000x - barra 1mm (Tanque de Infecção)

### 3.3.2 Histologia do baço

O baço é um órgão encapsulado, maciço e avermelhado. Pertence ao sistema linfático. O baço é dividido em polpa branca e polpa vermelha. Na Figura 20 (I e J) correspondente ao tempo 0 podemos observar o baço em estado normal. Ao longo da infecção o baço foi apresentando um aumento do número de macrófagos (K) assim como rompimento do epitélio (L).

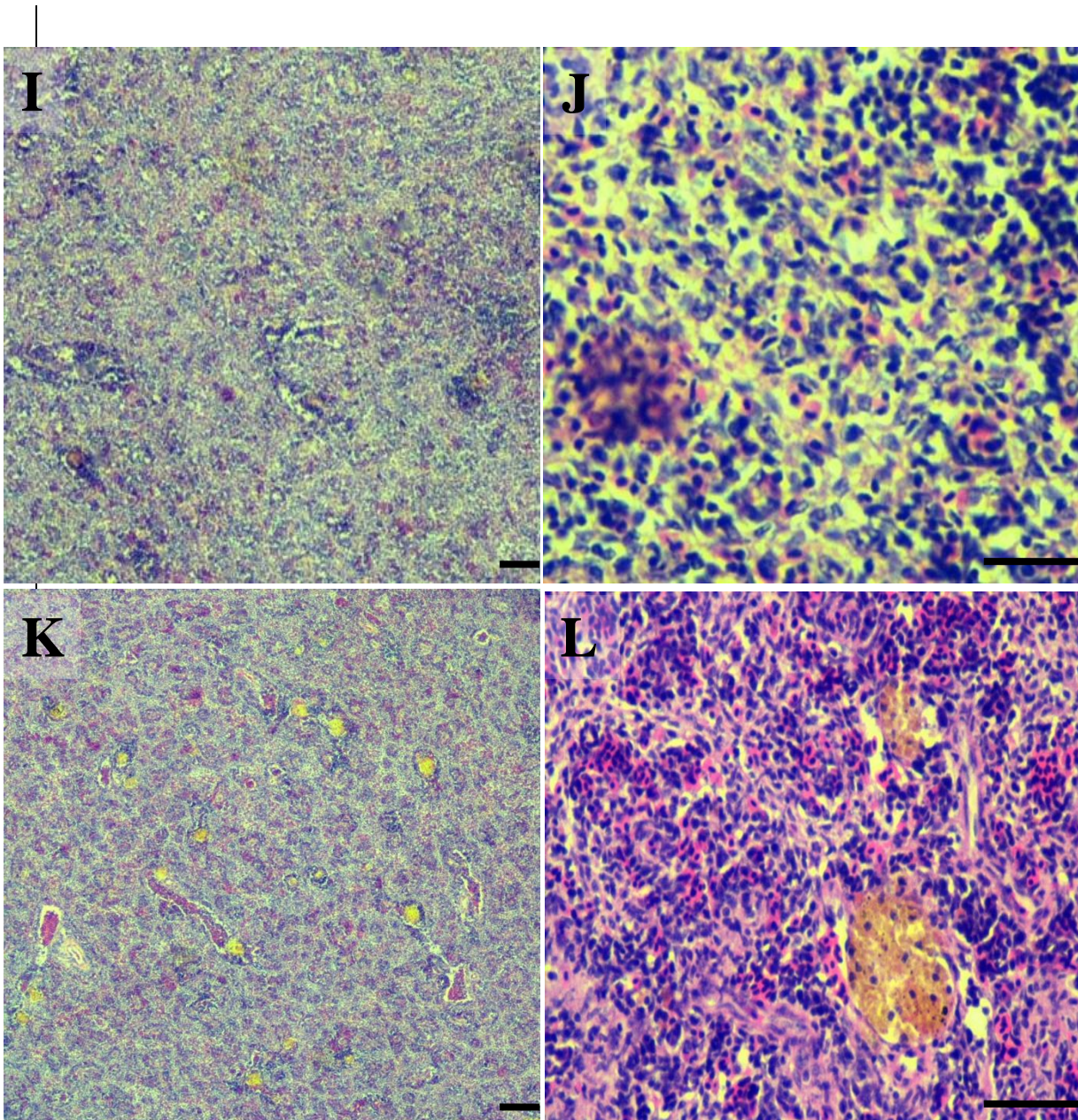


Figura 20 - Imagens de cortes histológicos de baços de *Argyrosomus regius* aquando infecção por *Amyloodinum ocellatum* (I) Baço T0 com ampliação de 100x - barra 1cm (J) Baço T0 com ampliação de 1000x - barra 1 mm (K) Baço T30 com ampliação de 100x - barra 1cm (L) Baço T30 com ampliação de 1000x - barra 1mm (Tanque de Infecção)

## **4. Discussão**

O dinoflagelado *A. ocellatum* é comumente identificado como um parasita com um forte impacto negativo em aquaculturas. Dados sobre a influência do parasitismo de *A. ocellatum* em *A. regius* encontram-se pouco descritos na literatura até aos dias de hoje, sendo referenciados pela primeira vez em corvinas de cultivo em Portugal por Soares et al., 2012b) em que estas surgiram num sistema de poli cultivo com douradas e infetaram as brânquias de ambas as espécies.

A nível hematológico foi observado que os valores iniciais de htc se encontravam a uma média de  $29\pm 3,7\%$  sofrendo uma diminuição significativa nos peixes dos tanques de infecção nas primeiras 4 horas, tendo apresentado valores médios de  $24\pm 3,1\%$ . Esta diferença foi causada por hemorragias nas brânquias, como foi observado histologicamente, tendo provocando anemia nos peixes; nas posteriores 20h do ensaio foi observada uma hiperplasia de hemácias (policitemia) tendo os valores médios subido para  $28\pm 6,9\%$ . O htc voltou a regredir no fim das 30h de ensaio apresentando valores de  $25\pm 6,2\%$ . No tanque controlo embora tenha sido observado variações ao nível do htc, estes valores não apresentaram diferenças significativas face ao valor médio inicial. Meyer et al. (2002) num trabalho com carpa, *Cyprinus carpio*, na presença do endoparasita *Trypanoplasma borreli* refere que com o aumento dos dias de contaminação os valores de htc e eritrócitos foram diminuindo o mesmo acontece num estudo de infecção de tilápias, *Oreochromis niloticus* com bactérias de Vásquez-Piñeros & Rondón-barragán, 2010. Os valores de hematócrito baixos indicam um estado de saúde debilitado, como refere Soares et al., 2012a num trabalho em que corvinas juvenis de cultivo desenvolveram um sarcoma na cavidade opercular.

Relativamente à resposta leucocitária, também considerada uma importante ferramenta para o controlo de infecções e saúde dos animais foi possível constatar que os glóbulos brancos também sofrem alterações significativas. Aquando o início do ensaio o número de leucócitos apresentavam valores de htc de 1,2%. Foi observado que o valor médio de leucócitos nas primeiras 4h horas foi inferior ao número de eritrócitos no htc e que ocorreu um aumento significativo na percentagem de monócitos, células responsáveis pela proteção contra invasores, remetendo a uma resposta imediata face ao invasor pelo sistema imunitário, sendo os leucócitos possivelmente destruídos. Foi também observada uma aparente trombocitopenia que pode estar relacionada com um colapso do fígado, uma vez que a produção de trombócitos se dá no fígado. Esta trombocitopenia, pode indicar que o peixe se encontrava num estado de stress elevado, comprovado pelos

valores que foram obtidos pelas análises de glicose e cortisol. No final do ensaio, foi observado através do htc um aumento da percentagem de leucócitos comparativamente com a percentagem de eritrócitos, esse resultado indica que o sistema imunitário continuou a combater a infecção com um aumento significativo dos monócitos, trombócitos e basófilos, como foi observado pela contagem e identificação das células sanguíneas. Foi possível também relacionar a diminuição percentual dos glóbulos vermelhos, com o rompimento do epitélio do baço, responsável pela hematopoiese (produção de células sanguíneas), que foi observado histologicamente. Os números elevados de leucócitos sugerem a presença de uma inflamação, tal como foi observado em dados imunológicos num trabalho com corvinas com o timo anormalmente desenvolvido (Soares et al., 2012a).

A análise comparativa entre os valores percentuais de eritrócitos e o índice somático do baço expôs uma relação inversamente proporcional entre estas duas variáveis. Foi observado que quando o valor percentual de eritrócitos era superior, o valor do SSI tendia a baixar, no entanto, no tempo a seguir foi observado que o SSI tendia a aumentar enquanto o valor percentual de eritrócitos tendia a diminuir. Lai et al. (2006) apresentou resultados semelhantes para trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* relacionando níveis de eritropoietina, que é a hormona glicoprotéica responsável pela produção de eritrócitos, e de hipóxia. Este autor refere que quando o SSI está elevado há uma posterior libertação de eritrócitos. Uma vez que o baço é um dos órgãos responsáveis pela produção de eritropoietina e que foi observada uma maior contaminação por arco branquial por dinósporos de *A. ocellatum*, dificultando a respiração dos peixes, foi possível relacionar estes dois parâmetros tal como no estudo referido. No entanto, La Frenz et al. (2012) num trabalho em que observou se existiam diferenças em quatro espécies diferentes de peixe-gato na presença de duas bactérias diferentes não encontrou diferenças significativas que pudesse considerar o SSI, um índice para identificação de uma inflamação.

Os resultados obtidos pela análise da hemoglobina permitiram a observação de um padrão semelhante entre a percentagem de eritrócitos e os valores de hgb que sendo uma metaloproteína presente nos glóbulos vermelhos se encontra diretamente relacionada com a diminuição dos valores encontrados no hematócrito, assim como, com os valores do SSI (Lai et al., 2006).

Ao longo do ensaio o comportamento dos peixes na presença do parasita foi sofrendo alterações. Foram observados aumentos de movimentos natatórios erráticos, respiração cada vez mais acelerada e aflita, proximidade da superfície e dos arejadores, fadiga e fome súbita, sendo agravados com o aumento do tempo de exposição ao parasita. Ramos & Oliveira (2001) relataram comportamentos semelhantes para o pregado *Psetta máxima*, na presença de *A. ocellatum*. Os peixes do tanque controlo apresentaram inicialmente uma respiração acelerada e desorientação que foram diminuindo com o tempo. Estes dados corroboram com o stress inicial que todos os peixes sofreram e indicam que os peixes do tanque de infecção sofreram para além do stress da transferência um stress adicional causado pela parasitose. No entanto, Guerra-Santos et al. (2012) não observou um comportamento tão evidente em *Rachycentron canadum*, apenas referindo alguns movimentos natatórios erráticos, letargia e proximidade dos arejadores.

Na presença de doença infecciosa é comum ser observado uma diminuição do índice de condição dos peixes doentes comparativamente com o IC dos peixes saudáveis. Soares et al., 2012a, observou que o IC dos peixes era afetado na presença de sarcoma no timo de corvina e que o IC dos peixes doentes era significativamente inferior com o IC dos peixes saudáveis. A análise dos parâmetros morfométricos (peso e comprimento do peixe) não apresentaram diferenças significativas entre os indivíduos do tanque controlo e do tanque de infecção, porém, foi possível justificar a diferença com a literatura com o facto da infecção por ser muito rápida. Este curto espaço de tempo não permite recolher dados significativos que revelem que a condição morfométrica do peixe foi afetada. No entanto, e apesar do IC ser uma ferramenta que auxilia a determinação do estado de saúde dos peixes, é importante, que exista uma combinação de análises, tais como análises hematológicas, imunológicas, de stress e histopatológicas, para fornecer dados complementares e mais específicos (Arts & Kohler, 2008).

A nível imunológico sabe-se que a lisozima é uma proteína conhecida por provocar a lise bacteriana através da destruição de um peptidoglicano presente na parede celular das bactérias. Esta enzima está presente no soro e muco dos peixes, sendo essencialmente associada aos leucócitos. Através da análise da lisozima foi possível a observação de um aumento significativo da atividade da mesma nos peixes do tanque de infecção, comparativamente aos peixes do tanque controlo, após 30h de infecção. Estes valores estão de acordo com o aumento de leucócitos observado através da contagem

das células sanguíneas. O aumento da atividade no plasma dos peixes infectados demonstra que o substrato destes é mais propenso a um crescimento bacteriano, não ocorrendo uma lise bacteriana tão alta nos peixes infectados como nos peixes controle, tal como acontece aquando uma infecção dos tecidos de órgãos como o timo, relatado por Soares et al. (2012a).

Martinez-Porchas et al. (2009) refere num trabalho sobre stress nos peixes que a glucose e o cortisol são os melhores indicadores de stress para estes animais. A análise aos níveis de glucose e cortisol presentes no plasma dos peixes, revelaram que os peixes se encontravam sobre elevado stress no início do ensaio, podendo estar relacionado com a transferência dos peixes do tanque inicial para os tanques controle e tanque de infecção. Grutter & Pankhurst (2000) referem num trabalho com peixes de recife de coral *Hemigymnus melapterus* que os níveis de cortisol e glucose são significativamente elevados após uma captura. Foi observado que nos peixes do tanque de infecção existiu uma hipoglicemia inicial mas que às 24h de ensaio os peixes já apresentam valores de glucose sem diferenças significativas dos iniciais, sendo estas causadas pelo período de fome assim como por uma série de reações negativas nos sistemas respiratório que foram observadas histologicamente a partir das brânquias e cardiovascular perante a presença do parasita. Estas reações foram observadas e relacionadas com o comportamento errático de fadiga e desorientação dos peixes. No entanto, foi observado que os níveis de glucose no tanque controle foram diminuindo ao longo do tempo estando relacionado com a aclimação dos peixes, como referem, Grutter & Pankhurst (2000) e pela continuidade da falta de alimento.

A observação dos resultados obtidos na análise do cortisol, além de demonstrarem o stress inicial a que todos os peixes foram sujeitos, que tal como acontece com a glucose, os peixes do tanque controle, mostram ao longo do ensaio uma diminuição significativa nos valores de cortisol corroborando com Grutter & Pankhurst (2000) que refere que o stress de uma captura, transporte ou transferência afeta bastante os níveis de cortisol. O aumento do cortisol reduz a atividade fagocitária e a produção de leucócitos. Após 24h de ensaio, foi observado um decréscimo do cortisol significativo seguido de um novo aumento exponencial, demonstrando que o peixe já revelava o excesso de efeitos negativos provocados pelo parasita. Estes dados mostram-nos que os níveis de stress provocados pelo transporte podem ser equiparados ao stress provocado por uma infecção (Grutter & Pankhurst, 2000).

A nível histopatológico foi observado, ao longo das 30h de infecção, uma hiperplasia e fusão lamelar nas brânquias, assim como, descolamento do epitélio respiratório e, posterior destruição do mesmo tal como acontece num trabalho de Guerra-Santos et al., (2012) em que se observam brânquias de *Rachycentron canadum* com diferentes graus de contaminação, classificando o estado das mesmas. Este autor afirma que quanto maior a exposição, mais agravado será o estado das brânquias, sendo o tecido mais afetadas pelo dinoflagelado. Montgomery et al. (1999), num estudo com *Polydactylus sexfilis*, e Guerra-Santos et al. (2012) num trabalho com *Rachycentron canadum*, referem que as brânquias são o local primário da infecção e o de eleição do *A. ocellatum*. No entanto, Cheung et al. (1981) refere que em estudos com o peixe-porco evidencia o aparecimento de trofontes na submucosa, músculo, tecido conjuntivo, entre outros tecidos internos, porém não apresentaram diferenças significativas nas células mostrando que o parasita interno poderá conviver com o hospedeiro. Os resultados obtidos no presente trabalho, demonstraram a existência de dilatações vasculares que conduziram ao aparecimento de aneurismas e posteriormente hemorragias. Histologicamente o baço foi apresentando, ao longo do tempo, um desarranjo celular e um aumento de número de macrófagos. Avci et al. (2013), descreve num trabalho com robalos e douradas infectados com bactérias o aparecimento de severas lesões e de destruição de alguns tecidos, assim como, o aparecimento de um elevado número de macrófagos, tal como descreve Birincioğlu et al. (2013) num trabalho com douradas que ocorrem necroses no fígado, baço e rim após uma infecção bacteriana severa. Agius & Roberts (2003) discutem num trabalho sobre a relação dos macrófagos com patologias associadas a peixes, que é comum o aumento de macrófagos perante stress ambiental, no envelhecimento dos peixes e perante inflamações. No entanto, e apesar da resposta fagocitária ter sido despoletada e o número de macrófagos ter aumentado consideravelmente, o desarranjo celular indicou que esta pode não ser suficiente perante uma forte infecção provocada pelo invasor.

Os dados hematológicos e imunológicos corroboram com a existência de uma resposta contra o invasor como já foi observado em trabalhos anteriores com dourada e robalo de aquacultura (Caruso et al., 2005). Lawler (1980); Paperna (1980); Woo & Ardelli (2014) referem que se o tratamento for aplicado em níveis iniciais de infecção que é possível que os peixes desenvolvam uma boa resposta imunitária e resistência ao parasita, tal como já aconteceu anteriormente em peixes como a tilápia azul, goraz e

robalo e, ainda, *Amphiprion frenatus* que exposto a doses sub-letais semanalmente, desenvolveu uma imunidade significativa.

## **5. Conclusão**

Esta dissertação contém dados sobre a resposta fisiológica da corvina face ao parasita externo *A. ocellatum*. A realização de análises hematológicas, imunológicas e histológicas permitem a obtenção de um maior conhecimento sobre a atuação do parasita e resposta do peixe face ao invasor.

Na presença do parasita assiste-se a uma diminuição da percentagem de eritrócitos e da hemoglobina nos peixes, assim como um aumento de leucócitos, ao longo do tempo, nos peixes infectados. Esta diminuição dos glóbulos vermelhos é causada pelas hemorragias provocadas pelo parasita nas brânquias e por danos causados no baço que causam anemia demonstrando que o sistema hematológico dos peixes foi afetado. O aumento dos leucócitos demonstra que existiu uma resposta por parte do sistema imunológico face ao invasor.

Os valores de lisozima aumentam no plasma dos peixes infectados ao fim de 30 horas, quando comparados com os peixes sem *A. ocellatum*, corroborando com uma atuação do sistema imunitário dos peixes na presença do parasita.

Foi também possível concluir através das análises de cortisol e glucose, e pela observação do comportamento, que as corvinas sofreram um elevado stress.

*A. ocellatum* afeta claramente o epitélio respiratório branquial das corvinas, observado histologicamente, destruindo-o e conduzindo os indivíduos à morte por anoxia. Assim como afeta o baço, destruindo o epitélio e, por conseguinte poderá limitar a produção de glóbulos vermelhos.

Neste trabalho foram apresentados pela primeira vez resultados histológicos dos danos causados nas brânquias e baço de corvinas contaminados com *A. ocellatum*.

Uma melhor compreensão sobre a forma como o parasita *A. ocellatum* afecta os peixes, nomeadamente a corvina, são uma contribuição valiosa para prevenir e controlar o seu aparecimento contribuindo para melhorar a rentabilidade da produção de corvina em cativeiro.

## **6. Bibliografia**

- Afonso-Dias, I. (2008) Visit to the fish market. 49 in Afonso-Dias, I., Menezes, G., Mackenzie, K. & Eiras, J.C. (Eds). Applied aspects of marine parasitology. *International Workshop on Marine Parasitology*, Horta 21-23 May 2006.
- Agius, C. & Roberts, R.J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 499-509.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(3-4), 171–198.
- Alvarez-Pellitero, P., Sitja-Bobadilla, A. & Franco-Sierra, A. (1993). Protozoan parasites of wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Mediterranean area. *Aquaculture and Fishery Management*, 24(1), 101–108.
- Arts, M.T. & Kohler, C.C. (2009). Health and Condition in Fish: The Influence of Lipids on Membrane Competency and Immune Response. *Lipids in Aquatic Ecosystems*, 237–256.
- Avci, H., Birincioglu, S., Epikmen, E. T. & Dereli, M. (2013). Comparative histopathological and immunohistochemical evaluations in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) naturally infected with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164(2), 72–79.
- Birincioglu, S.S., Aydoğan, A. & Avci, H. (2013). Pathological Investigations of Winter-like Disease in Cultured Sea Breams (*Sparus aurata*). *Academic Journal Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 19(2), 343–346.
- Caruso, G., Genovese, L., Maricchiolo, G. & Modica, A. (2005). Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquaculture International*, 13(1-2), 67–73.
- Cheung J.P., Nigrelli R.F. & Ruggieri G.D. (1981). *Oodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellata) in the kidney and other internal tissues of pork fish, *Anisotremus virginicus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 4, 523-525.
- Cobb, C. S., Levy, M. G. & Noga, E. J. (1998). Acquired immunity to amyloodiniosis is associated with an antibody response. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34(2), 125–33.
- Costas, B., Conceição, L.E., Aragão, C., Martos, J.A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J.M., Afonso, A. (2011) Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, 316, 68–76.
- Demers, N.E., & Bayne, C.J. (2010). The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*, 21(4), 363–373.

- Edler, L. & Elbrächter, M. (2010). The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. *Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analysis*, 13–20.
- FAO. (2014). World review of fisheries and aquaculture *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*, 1, 3-96.
- Fazio, F., Filiciotto, F., Marafioti, S., Di Stefano, V., Assenza, A., Placenti, F., Mazzola, S. (2012). Automatic analysis to assess haematological parameters in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 45(1), 63–73.
- Francis-Floyd, R. & Floyd, M.R. (2011). *Amyloodinium ocellatum*, an Important Parasite of Cultured Marine Fish. *Southern Regional Aquaculture Center* (4705).
- Grutter, A.S. & Pankhurst, N.W. (2000). The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *Journal of Fish Biology*, 57(2), 391–401.
- Guerra-Santos, B., Albinati, R.C.B., Moreira, E.L.T., Lima, F.W.M., Azevedo, T.M.P., Costa, D.S.P., Medeiros, S.D.C. & Lira, A.D. (2012). Parâmetros hematológicos e alterações histopatológicas em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com amyloodinose. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(11), 1184-1190.
- La Frenz, B.R., Shoemaker, C.A., Booth, N.J., Peterson, B.C. & Ourth, D.D. (2012). Spleen index and mannose-binding lectin levels in four channel catfish families exhibiting different susceptibilities to *Flavobacterium columnare* and *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 24(3), 141–147.
- Lai, J.C.C., Kakuta, I., Mok, H.O.L., Rummer, J.L. & Randall, D. (2006). Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. *The Journal of Experimental Biology*, 209(14), 2734–2738.
- Landsberg, J.H, Steidinger K.A., Blakesley B.A. & Zondervan. R. L. (1994). Scanning electron microscope study of dinospores of *Amyloodinium cf. ocellatum*, a pathogenic dinoflagellate parasite of marine fish, and comments on its relationship to the Peridiniales. *Diseases of Aquatic Organisms*, 20, 23-32.
- Lawler, A.R. (1980). Studies on *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellata) in *Mississippi Sound*. *Natural and Experimental Hosts*, 6(4), 403–413.
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L. T. & Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Journal of Aquatic Sciences*, 4, 158–178.
- Martoja, R. & Martoja-Pierson, M. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Paris-Masson, 347pp.
- Menezes, J. (2000) *Manual sobre Doenças de Peixes Ósseos*. Publicações Avulsas do IPIMAR. 3, 213.

- Meyer, C., Ganter, M., Körting, W., & Steinhagen, D. (2002). Effects of a parasite-induced nephritis on osmoregulation in the common carp *Cyprinus carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50(2), 127–135.
- Montgomery D., Brock J.A. & Sato V.T. (1999). Using hydrogen peroxide for Pacific threadfin infected by *Amyloodinium ocellatum*. Regional Notes, Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, The Oceanic Institute and the University of Hawaii, 10-45.
- Noga, E.J. and Levy, M.G. (1995). Dinoflagellida (Phylum Sarcocystophora) In: P. T. K. Woo (ed.) *Fish Diseases and Disorders*. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. Wallingford, Oxon, United Kingdom: CAB International. 1-25.
- Osserman, E F, Lawler. D. P. (1974). This Week's Citation Classic, 1984: Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 124, 921-952.
- Paperna, I. (1980). *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology. *Journal of Fish Diseases*, 3(5), 363–372.
- Paxinos, R., & Mitchell, J.G. (2000). A rapid Utermöhl method for estimating algal numbers. *Journal of Plankton Research*, 22(12), 2255–2262.
- Pereira, J.C., Abrantes, I., Martins, I., Barata, J., Frias, P., & Pereira, I. (2011). Ecological and morphological features of *Amyloodinium ocellatum* occurrences in cultivated gilthead seabream *Sparus aurata* L.; A case study. *Aquaculture*, 310(3-4), 289–297.
- Pickering, A.D., & Pottinger, T.G. (1983). Seasonal and Diel Changes in Plasma Cortisol Levels of the Brown Trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology*, 239, 232–239.
- Poli, B.M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., & Bonelli, A. (2003). Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish, 301–311.
- Poulin, R., & Morand, S. (2000). The diversity of parasites. *The Quarterly Review of Biology*, 75(3), 277–293.
- Ramos, P. & Oliveira, J.M. (2001). Amiloodiniose em pregado, *Psetta maxima* (L.) *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96(540), 201-205.
- Rigos, G., & Katharios, P. (2009). Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), 47–70.

- Saraiva, A., Jerónimo, D., & Cruz, C. (2011). *Amyloodinium ocellatum* (Chromalveolata: Dinoflagellata) in farmed turbot. *Aquaculture*, 320(1-2), 34–36.
- Smarra, A. L. S., De Azevedo, W. F., Fadel, V., Delatorre, P., Dellamano, M., Colombo, M. F., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2000). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of haemoglobin I from the armoured catfish *Liposarcus anisitsi*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 56(4), 495–497.
- Soares, F., Leitão, A., Moreira, M., Teixeira De Sousa, J., Almeida, A. C., Barata, M. & Ribeiro, L. (2012a). Sarcoma in the thymus of juvenile meagre *Argyrosomus regius* reared in an intensive system. *Diseases of Aquatic Organisms*, 102(2), 119–127.
- Soares, F., Moreira, M., & Ribeiro, L. (2012b). First report of *Amyloodinium ocellatum* in farmed meagre (*Argyrosomus regius*), 32(1), 2010–2013.
- Soares, F.; Quental Ferreira, H.; Cunha, E. & Pousão-Ferreira, P. (2011). Occurrence of *Amyloodinium ocellatum* in aquaculture fish production: a serious problem in semi-intensive earthen ponds. Aquaculture Europe (EAS) 18-21 Oct 2011, Rhodes (Greece), 1027pp.
- Tavares-Dias, M., & Moraes, F. R. (2007). Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 71(2), 383–388.
- Tidwell, J.H. & Allan, G. (2012). The role of Aquaculture. *Aquaculture Production Systems*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 1, 3-14.
- Vásquez-Piñeros, M. A. & Rondón-Barragán, I.S. (2010). Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis sp*, *Orinoquia* 14(1), 33–44.
- Verbeke, W., Sioen, I., Pieniak, Z., Van Camp, J., & De Henauw, S. (2007). Consumer perception versus scientific evidence about health benefits and safety risks from fish consumption. *Public Health Nutrition*, 8(4), 422–429.
- White, K., O'Neill, B., Tzankova, Z. (2004). At a crossroads: will aquaculture fulfill the promise of the blue revolution? *SeaWeb Aquaculture Clearinghouse*, Washington, DC. 4-5.
- Woo, P. T. K., & Ardelli, B. F. (2014). Immunity against selected piscine flagellates. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 268–279.
- Zambrano, J. L., Dezón De Fogel, D. E., González, C. R., & Gómez Fermín, E. (2001). Ciclo de vida de *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellata: Oodiniidae). *Boletín Del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente*, 40(1-2), 83–89.