



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**Testes com novos fármacos no tratamento do parasita de peixes *Amyloodinium ocellatum***

**Mónica Cristina Lopes Amaral**

**Dissertação**

**Mestrado em Aquacultura e Pescas**

**(Especialidade em Aquacultura)**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:**

Professor Doutor Adelino V. M. Canário

Doutor Pedro M. Guerreiro

2013



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**Testes com novos fármacos no tratamento do parasita de peixes *Amyloodinium ocellatum***

**Dissertação**

**Mestrado em Aquacultura e Pescas**

**(Especialidade em Aquacultura)**

**Autora:**

Licenciada Mónica Cristina Lopes Amaral

**Trabalho efetuado sob a orientação de:**

Professor Doutor Adelino V. M. Canário, Universidade do Algarve

Doutor Pedro M. Guerreiro, Centro de Ciências do Mar do Algarve

2013

ii

## **Testes com novos fármacos no tratamento do parasita de peixes *Amyloodinium ocellatum***

### **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.

A autora:

---

(Mónica C. L. Amaral)

Copyright<sup>®</sup> by Mónica Amaral

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar 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.

À minha família,

"I think using animals for food is an ethical thing to do,  
but we've got to do it right. We've got to give those animals  
a decent life and we've got to give them a painless death.

We owe the animal respect."

Temple Grandin

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Adelino Canário, pelos conselhos valiosos na escrita desta tese e pela disponibilidade demonstrada durante o decorrer deste estudo.

Ao Doutor Pedro Guerreiro pela disponibilidade ao longo de todas as etapas deste estudo, pelo seu bom humor, por todos os conselhos e principalmente pela sua paciência.

À Piscicultura do Vale da Lama, Lda. pela realização de várias tarefas nas suas instalações e pelo interesse demonstrado neste estudo.

Ao Grupo de Síntese e Reactividade Orgânica do Centro de Ciências do Mar pelo fornecimento dos fármacos utilizados neste estudo.

À Paula Canada pela ajuda inicial, pela transmissão dos seus conhecimentos e pelo interesse por este estudo.

À Elsa pela ajuda, disponibilidade e palavras sempre simpáticas durante o tempo passado no laboratório.

À minha família por me terem sempre apoiado em todas as decisões ao longo da vida. Principalmente aos meus pais, responsáveis pelo que sou hoje e que tornaram possível a realização do sonho de estudar aquacultura.

Às amigas de infância, da Universidade de Évora, da Universidade do Algarve, de Erasmus e às conquistadas durante a vida. Por vezes simples palavras foram essenciais para atingir os meus objetivos.

E em especial ao Bruno (Shark), por tudo.

A todos,

Muito Obrigada!

## Testes com novos fármacos no tratamento do parasita de peixes *Amyloodinium ocellatum*

### Resumo

O *Amyloodinium ocellatum* é um parasita dinoflagelado que aparece em aquaculturas por todo o mundo, infectando as brânquias e o tegumento dos peixes. Esta parasita é particularmente relevante na aquacultura mediterrânica onde os surtos causam perdas consideráveis. Apesar de já terem sido experimentados vários tratamentos, nenhum deles se revelou efectivo na erradicação do parasita e ainda alguns dos químicos utilizados podem ter importantes efeitos nocivos sobre o ambiente. Deste modo, o objectivo deste estudo foi testar novos fármacos para impedir o desenvolvimento e/ou eliminar o parasita em peixes já infectados. Os fármacos utilizados neste estudo foram endoperóxidos, uma recente classe de antimaláricos. Na primeira parte deste estudo realizaram-se ensaios *in vitro* onde se testaram os efeitos de diferentes concentrações (0,1mM; 1 mM; 2mM e 2,5mM) dos fármacos NAD17, NAD19, LCD93 e LCD67A sobre a divisão dos tomontes. Às 24 e 48 horas de exposição a 0,1mM NAD19 e 1mM LCD93, os tomontes observados não tinham entrado em divisão. Na segunda parte realizou-se um ensaio *in vivo* no qual os fármacos foram administrados a juvenis de dourada (*Sparus aurata*) a uma concentração de 10µmol/kg através de tratamento oral. No ensaio *in vivo* avaliou-se o possível efeito profiláctico dos fármacos na infecção através da análise da abundância e prevalência do parasita, da eficácia dos fármacos e dos efeitos do parasita e do tratamento na fisiologia e no eixo do stress dos animais infectados através de análises enzimáticas e de parâmetros bioquímicos do sangue. As medições realizadas ao plasma sanguíneo e às brânquias de douradas com diferentes níveis de infecção de *A. ocellatum* revelaram que não existe diferença significativa entre os controlos e os endoperóxidos para a dose testada. Será necessário realizar mais ensaios para obter conclusões sobre o efeito dos endoperóxidos no controlo do parasita de peixes *A. ocellatum*.

**Palavras-chave:** *Amyloodinium ocellatum*, endoperóxidos, fármacos, parasita de peixes.

## **Trials with new drugs in the treatment of the fish parasite *Amyloodinium ocellatum***

### **Abstract**

*Amyloodinium ocellatum* is a dinoflagellate parasite that occurs in aquacultures all over the world, infecting the gills and integument of fish. This parasite is particularly relevant in the Mediterranean Aquaculture, where the outbreaks cause considerable losses. Although there are several treatments, none of them managed to completely eradicate the parasite and, some of the compounds used may cause important adverse effects in the environment. Thus, the aim of this study was to test new drugs that could hold back the parasite development or eliminate it in fish that were already contaminated. The drugs tested were endoperoxides, a recent type of antimalarials. Trials in vitro were conducted to assess the drugs effect, in different concentrations (0,1mM; 1mM; 2mM and 2,5mM) of NAD17, NAD19, LCD93 and LCD67A, in the division of the tomites. In the tomites exposed to concentrations of 0,1mM NAD19 and 1mM LCD93 didn't occur division at 24 and 48 hours. In the second part of the experiment, trials in vivo were made in which the drugs were administrated to the seabream juveniles, with a concentration of 10µmol/kg, via oral treatment. In this trial it was evaluated the possible prophylactic effect caused by the drugs in the infection through analysis of the abundance, efficiency and prevalence of the parasite. The efficiency of the drugs and the effects of the parasite, and their impact on the physiology and stress axis of fish were also evaluated using an array of biochemical analysis on plasma. The analysis made in the plasma and gills of seabream with different levels of infection with *A. ocellatum* revealed no significant difference between the controls and the endoperoxides, for the tested dosages. It will be necessary to perform more trials to obtain better conclusions about the endoperoxides effect in the control of the fish parasite *A. ocellatum*.

**Keywords:** *Amyloodinium ocellatum*, endoperoxides, drugs, fish parasite.

## Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Patogenicidade em aquacultura .....	1
1.2.	Amiloodiniose – informação geral .....	2
1.3.	Taxonomia.....	2
1.4.	Ciclo biológico e morfologia.....	3
1.5.	Factores ecológicos que afectam o crescimento.....	4
1.6.	Principais hospedeiros e distribuição geográfica .....	5
1.7.	Transmissão.....	7
1.8.	Diagnóstico da infecção .....	7
1.9.	Sinais clínicos/patologia.....	8
1.9.	Resistência imunológica dos peixes a <i>Amyloodinium ocellatum</i> .....	9
1.9.1.	Imunidade inata .....	9
1.9.2.	Imunidade adquirida.....	10
1.10.	Profilaxia e Tratamento (químico, físico e biológico).....	11
1.11.	Aplicações de antimaláricos em aquacultura.....	13
2.	Objectivos.....	14
3.1.	Espécies – alvo .....	15
3.3.	Diagnóstico da infestação.....	16
3.4.	Recolha de parasita.....	16
3.5.	Fármacos .....	18
3.6.	Ensaio <i>in vitro</i> .....	20
3.6.1.	Observação do ciclo de vida do parasita .....	20
3.6.2.	Exposição aos endoperóxidos.....	22
3.7.	Ensaio <i>in vivo</i> .....	23
3.7.1.	Tratamento.....	23
3.7.2.	Circuito experimental .....	24
3.7.4.	Infecção dos animais-alvo .....	26
3.7.5.	Amostragem biológica .....	26
3.7.6.	Análises bioquímicas.....	27
3.7.6.1.	Análises ao plasma .....	27
3.7.6.2.	Medição da actividade Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase nas brânquias.....	28
3.8.	Análise estatística .....	29

4.	Resultados .....	30
4.1.	Isolamentos.....	30
4.2.	Ensaio in vitro.....	31
4.2.1.	Observação do ciclo de vida do parasita .....	31
4.2.2.	Exposição aos endoperóxidos.....	33
4.2.2.1.	Abundância relativa do parasita .....	33
4.2.3.	Índice de desenvolvimento do parasita.....	37
4.3.	Ensaio in vivo .....	39
4.3.1.	Animais .....	39
4.3.2.	Infecção .....	39
4.3.3.	Metabolitos.....	42
4.3.4.	Osmorregulação.....	49
4.3.5.	Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo .....	55
5.	Discussão.....	58
6.	Conclusão .....	65
7.	Considerações finais.....	65
	Referências bibliográficas .....	66

## Índice de figuras

Figura 1.1 – Ciclo de vida de <i>A. ocellatum</i> .....	3
Figura 1.2 – Endoperóxidos antimaláricos (1- artimisinina, 2- trioxalano OZ439, 3- tetraoxano) (O’neill <i>et al.</i> , 2010) .....	14
Figura 3.1 – Cronograma das etapas do ensaio in vivo.....	23
Figura 3.2 – Circuito experimental.....	25
Figura 4.2 – Abundância relativa do estado do parasita ao longo do tempo quando não esteve a 4°C (a) e quando esteve 1 dia a 4°C (b) (n = variável).....	32
Figura 4.3 - Índice de desenvolvimento do parasita ao longo do tempo quando não esteve a 4°C e quando esteve 1 dia a 4°C.....	33
Figura 4.4 – Abundância relativa do estado do parasita comparando o controlo, solvente e endoperóxido a 0,1mM de NAD17 (a), NAD19 (b) e LCD93 (c) às 24h e às 48h (n=variável).....	34
Figura 4.5 – Abundância relativa do estado do parasita comparando o controlo, solvente e endoperóxido a 1mM de NAD17 (a), NAD19 (b), LCD93 (c) e LCD67A (d) às 24h e às 48h (n=variável).....	35
Figura 4.6 – Abundância relativa do estado do parasita comparando o controlo, solvente e endoperóxido a 2 e 2,5mM de NAD17 (a), NAD19 (b) e LCD67A (c) às 24h e às 48h (n=variável).....	36
Figura 4.7 - Índice de desenvolvimento do parasita quando exposto a NAD17 (a), NAD19 (b), LCD93 (c) e LCD67A (d) a diferentes concentrações às 24 e 48 horas.....	37
Figura 4.8 – Índice de desenvolvimento do parasita quando exposto a NAD19 a diferentes concentrações às 24 e 48 horas.....	38
Figura 4.9 – Quociente do Índice de desenvolvimento do parasita do NAD19 e do respectivo índice do controlo às 24h e 48h.....	38
Figura 4.10 – Abundância média (número total de parasitas observados em 20 filamentos branquiais/número de peixes examinados) de douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> em diferentes tratamentos na 1ª (a) e 2ª amostragem (b).....	40
Figura 4.11 – Prevalência ((número peixes parasitados/ número de peixes examinados) x 100) nas brânquias em douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> submetidas a diferentes tratamentos orais na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n 1ª amostragem = 12; n 2ª amostragem = 17-18).....	41
Figura 4.12 – Eficácia (%) (100 – (100 x (média da abundância de parasitas no grupo de tratamento/média da abundância de parasitas no grupo de controlo)) dos tratamentos em douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> na 1ª e 2ª amostragem. n=12	

(1ª amostragem) e n=17-18 (2ª amostragem) (n 1ª amostragem = 12; n 2ª amostragem = 17-18).....	42
Figura 4.13 – Níveis de cortisol (ng ml <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de diferentes grupos de douradas expostas ao parasita. Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 5).....	43
Figura 4.14 – Níveis de cortisol (ng ml <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> expostas a diferentes tratamentos na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 8).....	44
Figura 4.15 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de cortisol (ng ml <sup>-1</sup> ) no plasma sanguíneo das douradas infectadas e não infectadas na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n=47-48).....	45
Figura 4.16 – Níveis de glucose (mmol l <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> expostas a diferentes tratamentos na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 8).....	46
Figura 4.17 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de glucose (mmol l <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas e não infectadas com <i>A. ocellatum</i> na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n=47-48).....	47
Figura 4.18 – Níveis de proteína (mmol l <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> expostas a diferentes tratamentos orais na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 8).....	48
Figura 4.19 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de proteína (mg ml <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas e não infectadas com <i>A. ocellatum</i> na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n=47-48).....	49
Figura 4.20 – Níveis de osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> expostas a diferentes tratamentos orais na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 8).....	50
Figura 4.21 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas e não infectadas com <i>A. ocellatum</i> na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n=47-48).....	51
Figura 4.22 – Níveis de cloro (mmol l <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> expostas a diferentes tratamentos na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 8).....	52
Figura 4.23 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de cloro (mmol l <sup>-1</sup> ) em plasma sanguíneo das douradas infectadas e não infectadas com <i>A. ocellatum</i> na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n=47-48).....	53
Figura 4.24 – Actividade de Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> - ATPase (µmol ADP/mg proteína/h) nas brânquias de douradas infectadas (■) e não infectadas (□) com <i>A. ocellatum</i> de douradas do grupo controlo	

e do grupo exposto ao tratamento oral com o endoperóxido NAD19 na 2ª amostragem. Os valores são as médias  $\pm$  erro-padrão (n = 3).....54

Figura 4.25 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e a actividade Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - ATPase ( $\mu$ mol ADP/mg proteína/h) nas brânquias de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum* na 2ª amostragem (n=12).....55

## Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Infecções provocadas por amiloodiniose registadas em peixes para consumo humano (esta tabela contém apenas registos de infecções onde o contágio foi identificado em fontes locais ou foi introduzido nas águas locais com o peixe. Não inclui registos de peixes em aquários) (Noga e Levy, 2006) .....	6
Tabela 3.1 – Isolamentos de tomontes (não inclui isolamentos fracassados) .....	17
Tabela 3.2 – Endoperóxidos fornecidos pelo Grupo de Síntese e Reactividade Orgânica.....	19
Tabela 3.3 – Classificação do estado do ciclo de vida do parasita.....	21
Tabela 3.4 – Doses (mM) de endoperóxidos e volumes de DMSO ( $\mu$ l) testados.....	22
Tabela 3.5 – Tratamento por tanque.....	26
Tabela 4.1 – Isolamento do parasita, quantidade isolada e utilização.....	31
Tabela 4.2 – Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo de douradas infectadas na 1ª amostragem. Teste de correlação de Pearson (n=47). Existe relação quando $p < 0,05$ .....	55
Tabela 4.3 - Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo de douradas não infectadas na 1ª amostragem. Teste de correlação de Pearson (n=48). Existe relação quando $p < 0,05$ .....	56
Tabela 4.4 - Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo de douradas infectadas na 2ª amostragem. Teste de correlação de Pearson (n=48). Existe relação quando $p < 0,05$ .....	56
Tabela 4.5 - Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo de douradas não infectadas na 2ª amostragem. Teste de correlação de Pearson (n=48). Existe relação quando $p < 0,05$ .....	57

## **1. Introdução**

### **1.1. Patogenicidade em aquacultura**

O conhecimento das doenças dos peixes e das suas zoonoses reveste-se de um interesse que vai para além do campo específico da patologia, da biologia e mesmo da saúde pública, revelando-se, cada vez mais, um instrumento ao serviço da ecologia e da dinâmica das populações marinhas. No entanto esta temática é sobretudo importante no caso particular da aquacultura onde, face às condições de produção, os problemas ligados à patologia, sanidade e profilaxia das doenças de organismos cultivados são ainda mais críticos e frequentemente, determinantes do sucesso desta actividade (Menezes, 2000).

Paralelamente ao crescente interesse e aos avanços na produção aquícola, detecta-se o aparecimento, com maior frequência, de patologias, constituindo estas um factor limitante ao desenvolvimento da cultura de algumas espécies, pois diminuem a produção e causam perdas económicas difíceis de avaliar e prever.

O aparecimento de uma doença nos peixes é o resultado da interacção entre patogénicos, hospedeiros e o meio ambiente (Zambrano *et al.*, 2001; Basurco e Toranzo, 2004). A elevada concentração de material biológico num volume restrito comparada com as condições naturais significa que as possibilidades para que ocorram doenças por contágio ou deficiente qualidade da água são maiores nos sistemas de produção de peixes que na natureza (Lekang, 2007). Este é um problema relevante para a aquacultura mundial que tem encontrado e em muitos casos, controlado com sucesso vários surtos de doenças de origens diversas, incluindo desequilíbrios fisiológicos ou aqueles provocados por factores abióticos, vírus, bactérias ou parasitas.

No nosso país são conhecidos prejuízos relacionados com doenças na piscicultura, nomeadamente bacterioses (vibriose e pasteurelose) e parasitoses (diplectanose, caligulose, ictioftiriose, amiloodiniose) (Menezes, 2000). Dentre os principais grupos de parasitas que afectam peixes marinhos e dulçaquícolas encontram-se os protozoários: ciliados, flagelados e esporozoos, que em oposição às formas de vida livre vivem em forma contínua ou descontínua na pele, brânquias, tecidos e órgãos internos (Zambrano *et al.*, 2001).

## 1.2. Amiloodiniose – informação geral

A amiloodiniose ou ‘marine velvet’, causada pelo dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931), com uma distribuição mundial e infectando mais de 100 espécies diferentes de água salgada e salobra (Kuperman e Matey, 1999), sendo ainda um dos poucos parasitas que consegue infectar tanto elasmobrânquios como teleósteos (Lawler, 1980 cit. Noga, 2012). *A. ocellatum* (Brown, 1931) é um parasita obrigatório que infecta principalmente as brânquias e o tegumento do peixe (Paperna, 1980; Cheung *et al.*, 1981; Kuperman e Matey, 1999; Ramos e Oliveira, 2001). Esta parasitose está também identificada em Portugal, tendo um impacto significativo na piscicultura semi-intensiva devido às características edafoclimáticas existentes no nosso país (Menezes, 2000).

## 1.3. Taxonomia

Para que seja possível um controlo efectivo dos dinoflagelados é necessário perceber a sua epidemiologia, incluindo os hospedeiros e o intervalo geográfico, assim como outros factores que afectam a sua transmissão. Os dinoflagelados são classificados em taxa zoológica e botânica pois têm características de plantas e animais, porém os estudos mais recentes de taxonomia destes parasitas utilizam a nomenclatura botânica (Noga e Levy, 2006).

Na classificação mais recente *Amyloodinium ocellatum* pertence ao Reino Protista, Filo Mastigofora, Classe Dinoflagelida, Ordem Blastodinida, Família Oodinidae (Arthur e Lumanlan-Mayo, 1997). Porém este parasita na classificação botânica pertence ao Filo Dinoflagelida, Classe Blastodinifuceae, Ordem Blastodinia, Família Oodinae (Cachon e Cachon, 1987; Fensome *et al.*, 1993), enquanto na classificação zoológica este organismo encontra-se no Filo Sarcomastigofora, Subfilo Mastigofora, Classe Fitomastigofora, Ordem Dinoflagelida (Levine *et al.*, 1980).

Este organismo possui uma mancha vermelha muito característica, o que dá origem ao nome da espécie, *ocellatum* junto à base, enquanto o núcleo grande e os numerosos grânulos de amido espalhados por todo o citoplasma explicam o nome genérico *Amyloodinium* (Conroy e Conroy, 2008). Até à data, apenas foi identificada uma espécie no género. Recentes estudos genéticos de 5 isolamentos de *A. ocellatum*, obtidos de peixes no Mar Vermelho (Israel), Mediterrâneo Oriental (Israel), Mar Adriático (Itália), Golfo do México (Florida), e de origem desconhecida, revelaram uma variação não significativa, indicando que todos os isolados são

da mesma espécie (Levy *et al.*, 2007). Porém os mesmos autores não eliminam a possibilidade de existirem diferentes estirpes pois observaram que 3 isolados variavam em comportamentos e morfologia. Alguns estudos de morfologia, como de Landsberg *et al.* (1994), sugerem a existência de múltiplas espécies. Serão necessários mais isolamentos de *Amyloodinium* de outras regiões geográficas e ecológicas que confirmem a existência de uma única espécie (Francis-Floyd e Floyd, 2011).

#### 1.4.Ciclo biológico e morfologia

O ciclo de vida do *A. ocellatum* tem três fases (figura 1.1): o trofante ou fase parasitária, com uma longevidade de 72 a 96 horas; o encapsulado (tomonte) ou fase reprodutiva, onde ocorrem até seis divisões sucessivas e o dinosporo ou fase dispersiva, que são células com a morfologia típica de um dinoflagelado (Zambrano *et al.*, 2001).

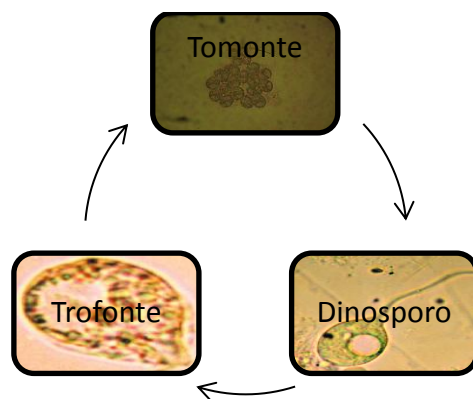


Figura 1.1 – Ciclo de vida de *A. ocellatum*

Os trofontes de *A. ocellatum* anexados ao corpo dos peixes, barbatanas, olhos e cavidade bucal são acastanhados ou amarelos, de forma esférica, ovóide ou piriforme (Cruz-Lacierda *et al.*, 2004; Kuperman e Matey, 1999) cuja dimensão pode variar entre 49x26  $\mu\text{m}$  e 120x79  $\mu\text{m}$  (Kuperman e Matey, 1999). No citoplasma é possível observar um núcleo esférico e grande, numa posição central com numerosos cromatófaros, grânulos de amido e vacúolos digestivos. Externamente possui uma cápsula pseudoquitinosa, na zona polar um estomatópodo, estrutura especializada na absorção de nutrientes e um pedúnculo curto com numerosos rizóides que permite penetrar e fixar-se ao hospedeiro. Possui um flagelo curto na base da abertura da cápsula e um estigma como órgão sensitivo (Zambrano *et al.*, 2001).

No final do processo de absorção dos nutrientes os rizóides e o estomatopódo são absorvidos através da abertura da cápsula que se fecha dando origem a um cisto ou tomonte (Zambrano *et al.*, 2001; Noga e Levy 2006).

Antes da primeira divisão do tomonte, a célula muda de forma, passando de ovóide para alongada e o citoplasma torna-se mais escuro, denso e sofre estrangulamento. Dentro do tomonte dividem-se os tomitos por fissão binária sincronizada normalmente a cada 9-10 horas. A cada estado do processo de divisão, o tomonte contém  $2^n$  tomitos de igual tamanho, por exemplo no primeiro processo de divisão o tomonte contém 2 tomitos ( $2^1$ ). O potencial reprodutivo do tomonte (número de divisões antes da esporulação) é determinado pelo tamanho inicial do tomonte quando é desalojado das brânquias, contudo as condições de incubação são importantes para obter a máxima capacidade reprodutiva. No final da divisão cada tomito diferencia-se e transforma-se em dois dinosporos, os quais escapam da cápsula do tomito, a este processo dá-se o nome de “esporulação”. Ocasionalmente, os dinosporos escapam do tomito enquanto ainda estão ligados uns aos outros e a separação final ocorre fora da célula mãe (Paperna, 1984b).

O dinosporo constitui o estado activo do parasita, na qual adopta a morfologia típica de um dinoflagelado com dois flagelos. Este estado obtém-se após a 6ª divisão com o rompimento da parede do tomito originando 64 dinosporos (Paperna, 1984b), porém alguns autores referem até 256 dinosporos (Menezes, 2000).

### **1.5. Factores ecológicos que afectam o crescimento**

Paperna (1984b) estudou o efeito da temperatura e da salinidade no ciclo de vida do *A. ocellatum* e observou que existe um efeito sinérgico da temperatura e da salinidade na tolerância da divisão dos tomites. O intervalo de temperaturas ideal para a divisão dos tomites e esporulação é de 18-30°C, porém ao intervalo médio de 23-27°C é quando a reprodução dos tomites é mais eficiente, ocorrendo esporulação em 2-3 dias. A 29-30°C há uma redução no número de divisões e a divisão final e esporulação terminam ao 4º dia, enquanto a 18-20°C a divisão dos tomites é mais lenta (uma divisão por 19-34h) e existe uma redução no sucesso da divisão (de 100% para 80-83%). O processo de divisão foi totalmente inibido a 8°C, mas recomeçou a 20°C, porém se a incubação durar 7-9 dias apenas 16% dos tomites retornam a divisão e poucos esporulam. Paperna (1984b) conclui que a

tolerância à salinidade é dependente das condições de temperatura ambiental. A uma temperatura de 24-25°C, o rendimento total da esporulação e a infecção efectiva dos peixes ocorre no intervalo de 10-60 ppt.

Pereira e os seus colaboradores (2011) estudaram os factores para a ocorrência do parasita em dourada em tanques de terra. No seu estudo o oxigénio dissolvido, a temperatura da água, o pH, a biomassa de fitoplâncton tiveram uma relação significativamente negativa com a ocorrência de *A. ocellatum*, enquanto a salinidade teve uma relação significativamente positiva com presença de trofontes de *A. ocellatum* nas brânquias. Este estudo é o primeiro que observa uma relação significativamente negativa entre a temperatura e a ocorrência de *A. ocellatum*.

### **1.6.Principais hospedeiros e distribuição geográfica**

Foram observadas ocorrências epizooticas tanto em peixes selvagens, tendo sido identificado a primeira vez na natureza em tilápias (*Oreochromis mossambicus*) do lago Salton Sea (Califórnia, Estados Unidos) (Kuperman e Matey, 1999), como cultivados, assim como peixes em aquários particulares e públicos (Francis-Floyd e Floyd, 2011). O parasita foi ainda encontrado a parasitar uma dourada (*Sparus aurata*) e o monogéneo *Neobenedenia melleni* que se encontrava a parasitar o peixe (Colorni, 1994).

A infecção foi tão severa em Espanha que em 2010 associações de aquacultura pediram ajuda ao Estado para compensar as perdas devido à mortalidade causada pelo parasita (Soares *et al.*, 2012a). Em Portugal, o parasita foi já identificado no robalo (*Dicentrarchus labrax*), dourada (*Sparus aurata*), sargo (*Diplodus sargus*) (Menezes, 2000), pregado (*Psetta maxima*) (Ramos e Oliveira, 2001), rodovalho (*Scophthalmus maximus*) (Saraiva *et al.*, 2011) e corvina (*Argyrosomus regius*) (Soares *et al.*, 2012b).

Na tabela 1.1 é possível observar a ocorrência de infecções provocadas pelo parasita por todo o mundo.

Tabela 1.1 – Infecções provocadas por amiloodiniose registadas em peixes para consumo humano (esta tabela contém apenas registos de infecções onde o contágio foi identificado em fontes locais ou foi introduzido nas águas locais com o peixe. Não inclui registos de peixes em aquários) (Noga e Levy, 2006).

Localização geográfica		Hospedeiro
Golfo do México	Mississippi, Texas, Luisiana, Florida	Robalo-muge ( <i>Morone saxatilis</i> ) Corvinão-de-pintas ( <i>Sciaenops ocellata</i> ) Tainha-olhalvo ( <i>Mugil cephalus</i> ) Seraia-da-Flórida ( <i>Trachinotus carolinus</i> )
Oceano Atlântico	Carolina do Norte	Híbrido ( <i>Morone chrysops</i> × <i>Morone saxatilis</i> ) Carta-de-verão ( <i>Paralichthys dentatus</i> )
	Carolina do Sul	Híbrido ( <i>Morone chrysops</i> × <i>Morone saxatilis</i> ) “Southern flounder” ( <i>Paralichthys lethostigma</i> )
	Florida	“Southern flounder” ( <i>Paralichthys lethostigma</i> )
	Florida Keys	Luciano ( <i>Lutjanus sp.</i> )
Oceano Pacifico	México	Bullseye puffer ( <i>Sphoeroides annulatus</i> )
	Hawaii	Barbudo de seis dedos ( <i>Polydactylus sexfilis</i> )
	Iloilo	Tainha ( <i>Chelon sp.</i> )
	Taiwan	“Ayu” ( <i>Plecoglossus altivelis</i> )
	Austrália	Roncadeira-austral ( <i>Argyrosomus japonicus</i> )
Mar das Caraíbas	Martinica	Robalo-legítimo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )
	Isla de Margarita	Sereia ( <i>Trachinotus goodei</i> , <i>T. carolinus</i> )
Mar Mediterrâneo	Espanha	Robalo-legítimo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )
	Itália	Robalo-legítimo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) Sargo-bicudo ( <i>Puntazzo puntazzo</i> )
	Sète, França	Dourada ( <i>Sparus aurata</i> )
	Israel	Robalo-legítimo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) Dourada ( <i>Sparus aurata</i> )
	Sicilia	Charuteiro-catarino ( <i>Seriola dumerili</i> )

Mar Adriático	Itália	Robalo-legítimo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )
Mar Egeu	Turquia	Dourada ( <i>Sparus aurata</i> )
Mar Vermelho	Eilat	Dourada ( <i>Sparus aurata</i> ) Robalo-legítimo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) Tainha-olhalvo ( <i>Mugil cephalus</i> ) Tilápia ( <i>Oreochromis aureus</i> )
Golfo Pérsico	Kweit	“Sobaity sea bream” ( <i>Acanthopagrus cuvieri</i> )

### 1.7. Transmissão

Os animais que se movem entre os sistemas de cultura podem ser veículos portadores do parasita transportando-o para áreas não infectadas. A infecção pode também ser transmitida através de dinosporos em gotas de água provenientes de aerossóis (Roberts-Thomson *et al.*, 2006). Dada a elevada resistência do tomonete, este parasita pode ainda ser transmitido por fómites (redes, sapatos, ferramentas comuns de limpeza, etc.) que tenham contactado com água ou sedimentos contaminado (Abreu *et al.*, 2005).

Os peixes mortos podem também ser um reservatório para o *Amyloodinium*, nos quais os trofontes caem para o sedimento e dividem-se sob a forma de tomontes ou podem até dividir-se no peixe morto. Por esta razão, é aconselhável remover os peixes mortos o mais rápido possível do sistema (Francis-Floyd e Floyd, 2011).

### 1.8. Diagnóstico da infecção

O quadro clínico dos animais com amiloodiniose é comum, em termos gerais, a todas as infecções cutâneas e branquiais, pelo que é necessário identificar o agente causador pela observação a fresco, entre lâmina e lamela, de raspagem da pele e pelo corte de filamentos branquiais de animais moribundos ou imediatamente após a morte (Menezes, 2000).

As grandes infecções na pele são fáceis de ver em peixes de coloração escura. A olho nu, os parasitas vêem-se melhor usando iluminação indirecta, como por exemplo uma lanterna sob o peixe num local escuro. A coloração da pele ou tecido branquial com solução de Lugol

diluído também ajuda a visualizar os parasitas, uma vez que o iodo reage com o amido presente no trofonte (Noga, 2012). É ainda possível a observação de tomontes através de peixes infectados colocados num recipiente contendo água destilada durante alguns minutos, os tomontes repousam no fundo do recipiente ao fim de 15 minutos (Bower *et al.*, 1987).

Uma técnica específica de reacção de polimerase em cadeia (PCR) é a única capaz de detectar uma única célula de qualquer uma das 3 fases do ciclo de vida do parasita (trofonte, tomonte, dinosporo) (Levy *et al.*, 2007), porém esta técnica está longe de ser usada em aquaculturas pois acarreta custos consideráveis e requer equipamento específico (Plumb, 2001).

### **1.9. Sinais clínicos/patologia**

Este parasita que tem grande tolerância osmótica, afecta inúmeras espécies de peixes marinhos de águas quentes, localizando-se na pele e brânquias. Sintomatologicamente o quadro é comum a outras parasitoses cutâneas e branquiais. Esta caracteriza-se por alteração do comportamento dos peixes (Menezes, 2000; Ramos e Oliveira, 2001), com movimentos bruscos, saltando fora de água de boca aberta (dispneia), roçando-se nas paredes dos tanques (prurido) e diminuição do apetite (Menezes, 2000; Ramos e Oliveira, 2001; Conroy e Conroy, 2008). Com o aumento da infecção o apetite é abolido (anorexia), acentua-se a dificuldade respiratória e começam a surgir erosões nas brânquias e na pele, com descamação mais ou menos extensa, observaram-se também alterações da pigmentação da pele tais como o aparecimento de manchas de despigmentação/hiperpigmentação, congestão e erosão das barbatanas, hipersecreção mucosa cutânea e dilatação do ventre (Menezes, 2000; Ramos e Oliveira, 2001). A morte é normalmente atribuída à anoxia e pode ocorrer dentro de 12 horas, especialmente em infestações severas (Lawler, 1980 cit. Noga, 2012). Em contraste, mortalidades agudas são por vezes associadas a infestações pequenas (por exemplo um ou dois trofontes por filamento branquial), sugerindo que a hipoxia não é sempre a causa da morte. A insuficiência osmorreguladora e infecções microbianas secundárias devido a severas lesões do epitélio podem também ser importantes causas de debilitação e morte (Noga, 2012).

Em relação à prevalência do parasita no peixe, Paperna (1980) observou que as infecções provocadas pelo *A. ocellatum* a juvenis e reprodutores de dourada e robalo encontram-se predominantemente nas brânquias e tegumento da mucosa, mas em larvas encontram-se mais na pele do que nas brânquias.

O único caso documentado da presença de trofontes nos tecidos e órgãos internos aconteceu no roncadador-listado-americano (*Anisotremus virginicus*). O mecanismo pelo qual o parasita atingiu estas áreas invulgares não está determinado, no entanto assume-se que tenha sido no estado de dinosporo (único estado capaz de se mover) através da faringe (Cheung *et al.*, 1981).

### **1.9. Resistência imunológica dos peixes a *Amyloodinium ocellatum***

Apesar da importância de *A. ocellatum*, sabe-se relativamente pouco sobre os mecanismos de protecção pelos quais o peixe hospedeiro pode resistir à infecção (Smith *et al.*, 1993).

#### **1.9.1. Imunidade inata**

Lawler (1977) (cit. Noga, 2012) observou que algumas espécies de peixes são naturalmente mais resistentes à infecção que outras, estas são geralmente as que produzem muco espesso ou conseguem tolerar baixos níveis de oxigénio, presumivelmente devido à capacidade destas espécies para resistir ao ataque do parasita ao tecido epitelial. Algumas destas espécies incluem “gulf killifish” (*Fundulus grandis*), enguia americana (*Anguilla rostrata*), molinésia latipina (*Poecilia latipinna*).

A superfície do corpo é a primeira linha de defesa e é uma importante barreira contra a fixação e penetração pelos parasitas. Algumas secreções da pele contêm lisozimas que podem danificar a superfície da membrana dos parasitas, enquanto outros (por exemplo, muco) bloqueiam a adesão de parasitas às células epiteliais e eliminam-nas mais tarde (Woo, 2007). Landsberg e os seus colaboradores (1992) observaram que a infecção de *A. ocellatum* numa cultura celular foi significativamente reduzida após exposição a muco e soro de tilápias (*O. aureus*) que nunca tinham sido infectadas. No entanto, o muco teve, consideravelmente, uma menor actividade inibitória, pelo menos para esta espécie. Para além do soro, a pele, as brânquias e o baço da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e do híbrido “striped bass” têm proteínas letais para o *A. ocellatum* (Noga *et al.*, 2001). A informação da espectrometria de massa e da sequência de aminoácidos sugere que estas proteínas estão muito relacionadas com a histona H2B e a histona H1, por este motivo são designadas de proteínas do tipo das histonas (HLPs). Estas HLPs são pequenas (13-21kDa) e a maioria da sua actividade antibiótica encontra-se na epiderme, contudo alguma dessa actividade está presente no muco.

Existe a evidência experimental que a actividade destas proteínas é dirigida contra o estado trofante (alimentação) do parasita, enquanto o dinosporo não é afectado. Esta toxicidade preferencial para trofontes não é comum quando comparada com outras drogas típicas usadas para tratar a amiloodiniose (por exemplo, cobre e formalina), as quais normalmente têm como alvo os dinosporos (Noga *et al.*, 2001). O mecanismo responsável pela toxicidade das HLPs contra o *Amyloodinium* não é conhecido (Noga *et al.*, 2001). No entanto o principal sítio de acção da maioria dos endobioticos pensa-se que seja no plasma da membrana, onde estes causam a formação de um poro ou a lise da membrana (Hancock e Lehrer, 1998). Por outro lado, foi demonstrado que o *magainin2*, um antibiótico produzido na pele do sapo africano (*Xenopus laevis*), é igualmente tóxico tanto para trofontes quanto para dinosporos (Noga *et al.*, 2001).

Recentemente foi descoberto o efeito antiparasitário da piscidina tipo 2 contra ectoparasitas protozoários. Porém a eficácia da piscidina 2 sintetizada em laboratório foi baixa contra o *A. ocellatum*, propagado continuamente *in vitro*, quando comparada com ectoparasitas dulçaquícolas (Colorni *et al.*, 2008).

### **1.9.2. Imunidade adquirida**

Até ao momento, não existem vacinas comerciais disponíveis para o tratamento de parasitas protozoários de peixes, incluindo dinoflagelados (Woo, 2007). Contudo, recentes estudos têm identificado importantes mecanismos de defesa contra o *A. ocellatum*. Paperna (1980) não observou surtos de hiperinfecção de grupos de peixes sobreviventes de epizootias anteriores.

Estudos examinando a resposta humoral do parasita demonstraram que o soro de *O. aureus* imunizadas com antigénios vivos ou sonicados de dinosporos produziram uma resposta anticorpo específica que foi detectada pelo método ELISA. A resposta humoral não foi detectada após 8 semanas da primeira imunização com dinosporos sonicados, mas após uma dose intensificadora à 9ª semana, a resposta aumentou e teve um pico à 12ª semana. Ao longo das seguintes 6 semanas os anticorpos diminuíram, mas a resposta continuou a ser positiva até à 18ª semana, quando terminou a experiência (Smith *et al.*, 1992). Igualmente, o soro de tilápias azuis (*Oreochromis aureus*) imunizadas intraperitonealmente com dinosporos de *A. ocellatum* diminuiu a motilidade e a capacidade de infectar de dinosporos vivos e o crescimento de trofontes em culturas celulares (Smith *et al.*, 1993).

Outros estudos experimentais em *Amphiprion frenatus* demonstraram que o peixe desenvolve uma forte acção de imunidade contra infecções do parasita após repetidas exposições não-letais e que os anticorpos específicos estão associados a essa resposta (Cobb *et al.*, 1998). Também Cecchini e os seus colaboradores (2001) observaram que alguns robalos desenvolvem uma resposta imunológica adaptativa contra o parasita. Os resultados mostram uma imunidade adquirida contra o *A. ocellatum*, podendo os peixes desenvolver uma resistência parcial contra novas infecções do dinoflagelado.

### **1.10. Profilaxia e Tratamento (químico, físico e biológico)**

O controlo de surtos de amiloodiniose é uma das principais preocupações em mariculturas. Quando é diagnosticado, é necessária uma intervenção rápida, nomeadamente na implementação de um tratamento eficaz contra o *Amyloodinium ocellatum* e seguro para o peixe, de forma a evitar uma rápida perda de “stock” (Ramos e Oliveira, 2001).

Apesar da forma livre (dinosporo) ser susceptível à quimioterapia (Lawler, 1980, cit. Noga, 2012), o estado parasitário (trofonte) e o estado encapsulado (tomonte) são resistentes. O método mais comum de tratamento em controlo e eliminação do parasita é o cobre sob a forma de sulfato de cobre – um químico largamente utilizado em agricultura (Soares *et al.*, 2012a). Após o desalojamento dos trofontes dos tecidos do hospedeiro, o processo de encapsulação e divisão ocorre normalmente até à esporulação porque a parede da célula limita a entrada de iões cobre. Na esporulação, os dinosporos são expostos ao efeito citotóxico do cobre, deste modo interrompe-se o ciclo de vida do parasita (Paperna, 1984b). Segundo Canosa (2006) os tratamentos com cobre devem durar 10-14 dias para controlar a doença, a uma concentração de 0,12-0,2 mg.l<sup>-1</sup>. No entanto, Vaz (2010) ao expor juvenis de sargo (*Diplodus sargus*) a 0,2 mg.l<sup>-1</sup>, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 1 mg.L<sup>-1</sup> durante 23 dias e 0,25 mg.L<sup>-1</sup> e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> durante 60 dias, observou evidências do efeito tóxico durante a exposição ao sulfato de cobre, com um aumento da concentração de cobre no fígado acompanhada por alterações morfológicas nos peixes.

Todos os agentes (formalina (25-200 ppm), Nitrofurazone (10-50 ppm) e Furanace (0.1-10 ppm)) utilizados por Paperna (1984a) no controlo do parasita induziram um efeito gradual inibitório na taxa de divisão dos tomontes.

Os juvenis de tainha-olhalvo (*Mugil cephalus*) tratados durante 30 minutos com 25ppm de peróxido de hidrogénio não foram afectados negativamente por esta concentração e o mesmo tratamento permitiu parar um surto de amiloodiniose (Montgomery-Brock *et al.*, 2000). Num estudo similar com *Polydactylus sexfilis*, apenas um tratamento com peróxido de hidrogénio a 75 ou 150 ppm durante 30 minutos foi eficaz a eliminar trofontes das brânquias sem causar perdas de peixes (Montgomery-Brock *et al.*, 2001). Também Cruz-Lacierda e os seus colaboradores (2004) realizaram tratamentos de 1h de água doce e 200 ppm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *Chanos chanos* e *Lutjanus argentimaculatus*, os quais foram eficazes na eliminação do parasita e não tiveram qualquer efeito adverso sobre o peixe.

Muitos outros tratamentos químicos foram testados contra o *A. ocellatum*, como por exemplo 3,N-metilglucamina (Oestmann e Lewis, 1996), formalina (Paperna, 1980; Paperna, 1984a) ou até mesmo tratamentos homeopáticos (Santos, 2011), porém a maioria tem demonstrado limitações ou nenhum sucesso contra a amiloodiniose.

O *A. ocellatum* tolera um intervalo de temperatura e salinidade muito grande, o que torna o controlo desta doença pela manipulação dos parâmetros químicos e físicos muito difícil (Soares *et al.*, 2012a). No entanto, é possível a inibição do crescimento do parasita reduzindo a temperatura e a salinidade (Paperna, 1984a). A colocação de peixes em água doce causa o desalojamento da maioria dos trofontes (Bower *et al.*, 1987), porém as medidas com base na redução da salinidade não podem ser facilmente e rapidamente aplicadas em tanques de terra e em espécies que não toleram variações de salinidade elevadas, como a maioria das espécies de aquacultura no sul da Europa (Soares *et al.*, 2012a). Recentemente, um estudo de Pereira *et al.* (2011) referiu que a manutenção da qualidade da água com uma definição da densidade do stock poderá evitar infecções na dourada.

Para além do controlo químico e físico, foi ainda testado em laboratório o controlo biológico com *Artemia* spp. (Oestmann *et al.*, 1995) e ostras (*Crassostrea gigas*) (Severino, 2008) sob os dinosporos. Uma ênfase nos tratamentos biológicos poderá contribuir para o aumento da qualidade dos produtos de pisciculturas (Soares *et al.*, 2012a).

Em termos de prevenção da introdução do parasita no sistema devem ser tomadas medidas de profilaxia em tanques de aquacultura: os peixes devem ser tratados em diferentes tanques para evitar a formação de tomontes nos tanques de cultivo; tanques onde os peixes mostrem sintomas da doença, deve ser removido o biofilme através de escovação e uso de ácido clorídrico; a abundância de tomontes e o seu estado de desenvolvimento deve ser monitorizado no biofilme do fundo dos tanques; a presença de trofontes ou tomontes em peixes vivos dados como alimento deve ser controlada, os tanques devem ser separados e o

equipamento isolado para evitar cruzamento da contaminação (Abreu *et al.*, 2005). Pode ainda reduzir-se o risco de introduzir dinosporos no sistema de uma aquacultura através de desinfecção (por exemplo, radiação ultravioleta, ozono ou cloro) na entrada da água (Lawler, 1977 cit. Noga, 2012). No entanto, estas práticas são difíceis de aplicar em tanques de terra.

### **1.11. Aplicações de antimaláricos em aquacultura**

Carol Bower verificou que o antimalárico difosfato de cloroquina é seguro e efectivo a tratar a amiloodiniose de peixes palhaços (*Amphiprion ocellaris*) infectados. A cloroquina foi o primeiro fármaco de síntese utilizado para o tratamento da Malária (Brunton *et al.*, 2006). Após 10 dias expostos a um único tratamento aquoso de 5-10mg/L de difosfato de cloroquina não houve efeito na divisão dos tomontes, mas os dinosporos morreram imediatamente a seguir ao seu encistamento. Esta concentração não é tóxica para o peixe, mas é altamente tóxica para micro e macroalgas e vários invertebrados (C.E Bower, Connecticut, comunicação pessoal cit. Noga, 2012) e não pode ser usada em tanques de recife, pelo menos como fórmula aquosa.

A farmacocinética da cloroquina administrada por via oral em corvinão-de-pintas (*Sciaenops ocellata*) produzido em cativeiro, poderia parecer uma forma efectiva como medicamento oral (Lewis *et al.*, 1988). Contudo, a cloroquina é muito cara e não é susceptível de ser aprovada para uso em peixes para alimentação (Noga e Levy, 2006; Noga, 2012).

Xenobióticos (Cicloheximido, desferrioxamino, 2,2-bipiridil, pirimetamina, sulfadiazina, ciprofloxacina, cloroquina, artimisinina, atovaquone) conhecidos pelas suas propriedades antimaláricas e antiprotozoárias foram testados contra o *Perkinsus olseni*, um parasita que afecta as culturas de amêijoas e no qual o Fe (II) é essencial na sua proliferação. Destes, apenas o desferrioxamino foi efectivo na redução das infecções *in vivo* (Elandalloussiet *et al.*, 2005).

Recentemente surgiu uma nova classe de antimaláricos, os endoperóxidos (figura 1.2). Segundo Delves *et al.* (2012), os endoperóxidos podem ser aplicados em testes de fármacos contra outros patogénicos com ciclos de vida complexos.

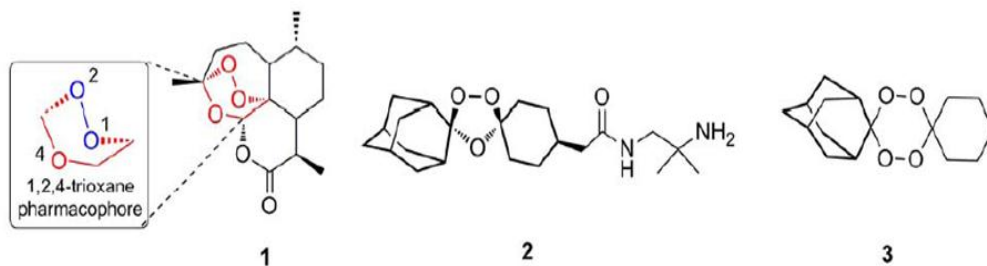


Figura 1.2 – Endoperóxidos antimaláricos (1- artimisinina, 2- trioxalano OZ439, 3- tetraoxano) (O'Neill *et al.*, 2010).

## 2. Objectivos

O principal objectivo deste estudo foi a caracterização dos efeitos de fármacos endoperóxidos sintéticos no desenvolvimento e patogenicidade do parasita *A. ocellatum*, com o intuito de inibir a produção de estados infestantes. Devido ao seu ciclo de vida, com uma fase enquistante, a erradicação deste parasita ainda não é possível. A descoberta de métodos que permitam o tratamento dos animais, quer por destruir os estados iniciais do parasita quer por criar resistência no hospedeiro, ou pela eliminação dos quistos dos tanques, tem grande valor para a indústria.

Numa primeira fase foram testados fármacos *in vitro* sob a fase de tomonte (quisto), de modo a perceber qual(ais) o(s) endoperóxido(s) que tem efeito na divisão do parasita. Enquanto numa segunda fase foram realizados ensaios *in vivo* com o objectivo de avaliar a eficácia dos diferentes endoperóxidos quando administrados sob a forma de vacina oral sobre o controlo do *Amyloodinium* em douradas, através da avaliação da eficácia, prevalência e incidência parasitária.

## **Material e Métodos**

A infecção e obtenção de *Amyloodinium ocellatum* realizaram-se tanto no Laboratório Experimental para Organismos Aquático (LEOA) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, como no laboratório da Piscicultura do Vale da Lama, Lda.

Os ensaios *in vitro* e bioquímicos foram realizados no laboratório de Fisiologia Adaptativa e Bioquímica do Grupo de Investigação em Endocrinologia Comparativa e Molecular do Centro de Ciências do Mar (CCMAR), enquanto o ensaio *in vivo* decorreu no laboratório da Piscicultura do Vale da Lama, Lda.

### **3.1. Espécies – alvo**

Foram utilizados neste estudo peixes da espécie robalo (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*Sparus aurata*). Estas espécies são produzidas na piscicultura e os seus ciclos de vida, bem como os requisitos alimentares são bem conhecidos, deste modo a sua manutenção em cativeiro e o seu manuseamento são de fácil execução. Todos estes factores são vantajosos na escolha de um organismo modelo, e neste caso, a fácil disponibilidade, a sua importância comercial bem como o vasto conhecimento que existe sobre as espécies, e o facto de serem o principal alvo do parasita na indústria de aquacultura em Portugal foram determinantes para a escolha destes espécimes como modelos experimental neste estudo.

### **3.2. Infecção dos peixes**

Para o início e propagação da infecção dos peixes, com o intuito de obter parasitas para os ensaios, foram realizados dois métodos, um utilizando sedimento com parasitas e outro através de lavagem com água doce de peixes infectados.

O sedimento infectado foi utilizado para obter parasitas para os ensaios *in vitro*. Este método consistiu em colocar peixes em aquários montados com sedimento proveniente de tanques terra onde ocorreram surtos de *Amyloodinium ocellatum*, água salgada, arejamento constante e termóstato. A temperatura foi aumentada gradualmente até aproximadamente 24°C.

O outro método consistiu em lavar com água doce as brânquias e o tegumento de peixes infectados e adicionar a água da lavagem a aquários onde se encontravam peixes.

### **3.3. Diagnóstico da infestação**

O diagnóstico da infecção adaptado de Francis-Floyd e Floyd (2011) consistiu em retirar o peixe do aquário com um camaroeiro e coloca-lo sob uma superfície plana não abrasiva. Os olhos foram tapados para manter o peixe quieto enquanto se realizou a biópsia.

O material recolhido para biópsia foi uma pequena quantidade de filamentos branquiais de modo a não ser um método letal para o peixe. Os animais não foram anestesiados pois de acordo com Francis-Floyd e Floyd (2011) os anestésicos podem causar o desalojamento do parasita do peixe, o que poderia resultar em falsos negativos aquando da observação do material sob a luz do microscópio.

Para a realização de uma biópsia às brânquias, o opérculo foi levantado cuidadosamente e com uma tesoura pequena foram cortadas as pontas dos filamentos branquiais e logo de seguida colocadas numa lâmina, adicionada água salgada e colocada uma lamela.

A observação ao microscópio foi realizada logo após a conclusão da preparação a uma ampliação de 100x num microscópio Olympus CH2 ou num BMS - E1, consoante o diagnóstico tenha sido realizado no Laboratório Experimental para Organismos Aquático (LEOA) ou no laboratório da Piscicultura do Vale da Lama, Lda.

### **3.4. Recolha de parasita**

O método inicialmente utilizado para isolar os parasitas dos peixes infectados (tabela 3.1) foi adaptado de Bower *et al.* (1987). Para remover os trofontes, os peixes infectados foram capturados com camaroeiro e colocados num gobelé de 750 ml, cheio até metade com água destilada. Após cerca de 5 minutos os peixes foram colocados de volta no aquário. A suspensão de tomontes passou uma vez por filtros de 200 e 150  $\mu\text{m}$  para filtrar pequenos grãos de areia e outras impurezas que ficaram na suspensão quando os peixes foram colocados no gobelé e deixada a repousar durante 20 min para os tomontes precipitarem. Realizaram-se mais 2 lavagens com água destilada e 2 com água salgada filtrada (33 ppt).

Entre cada lavagem os tomontes foram deixados a repousar no fundo do gobelé durante 15-20min e a água removida por sifonagem através de uma pipeta de Pasteur ligada a uma bomba de vácuo. Após a última lavagem fez-se a contagem de tomontes utilizando uma câmara de Bürker. O método de isolamento do parasita (tabela 3.1) foi adaptado de Roberts-Thomson *et al.* (2006) e passou a consistir em remover os trofontes das brânquias através de jactos de água destilada para caixas de Petri. Sob a luz reflectida de uma lupa binocular Zeiss Stemi DV4 agitou-se a placa de Petri de modo a concentrar no centro os tomontes. Os tomontes foram recolhidos com uma micropipeta, de modo a minimizar a área de exposição, para um frasco contendo água salgada (50ppt) sobre gelo. O gelo serviu para evitar que os tomontes iniciassem o processo de divisão e a água salgada serviu para manter a salinidade a cerca de 35ppt – importante da viabilidade dos tomontes (Paperna, 1984b) - pois ao pipetarem-se os tomontes da caixa de Petri pipeta-se sempre uma pequena quantidade de água doce. Após serem lavadas as brânquias dos peixes infectados, o frasco foi agitado e pipetaram-se 1 ou 2µl de volume 3 vezes para uma lâmina para contar através do microscópio a uma ampliação de 50x o número de tomontes e deste modo determinar a concentração de tomontes isolados.

Tabela 3.1 – Isolamentos de tomontes (não inclui isolamentos fracassados).

Isolamento	Local	Nº peixes	Espécie	Técnica de isolamento	Material de contagem
13-01-2012	LEOA	7	Robalo	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker
25-01-2012	LEOA	3	Robalos	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker
28-01-2012	LEOA	3	Robalos	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker
04-02-2012	Aqualvor, Lda	9	Robalos	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker
24-04-2012	LEOA	3	Douradas	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker
28-04-2012	LEOA	6	Douradas	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker
04-05-2012	LEOA	3	Douradas	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker
10-05-2012	LEOA	5	Douradas	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker
17-05-2012	LEOA	3	Douradas	Bower <i>et al.</i> (1987)	Câmara de Burker

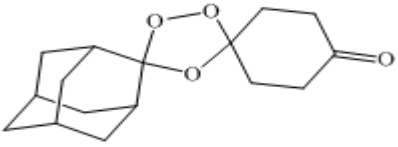
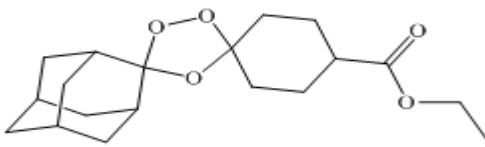
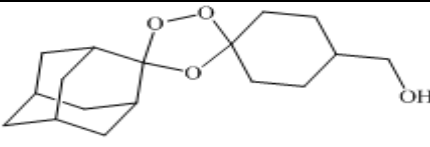
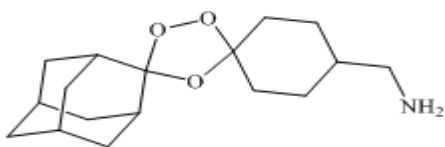
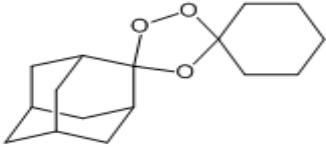
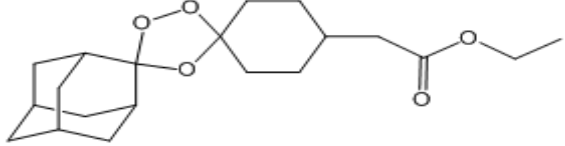
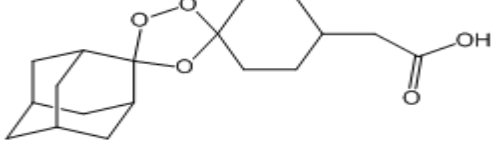
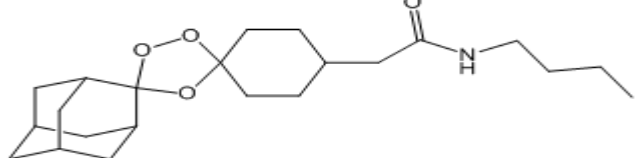
23-05-2012	Aqualvor, Lda	10	Robalos	Lavagem brânquias	Lâmina
04-06-2012	Aqualvor, Lda	10	Robalos	Lavagem brânquias	Lâmina
18-06-2012	Aqualvor, Lda	10	Robalos	Lavagem brânquias	Lâmina
13-07-2012	Aqualvor, Lda	10	Robalos	Lavagem brânquias	Lâmina
21-07-2012	Aqualvor, Lda	10	Robalos	Lavagem brânquias	Lâmina
29-07-2012	Aqualvor, Lda	10	Robalos	Lavagem brânquias	Lâmina
15-09-2012	Aqualvor, Lda	10	Robalos	Lavagem brânquias	Lâmina

### 3.5.Fármacos

Os fármacos utilizados no ensaio foram endoperóxidos sintetizados pelo Grupo de Síntese e Reactividade Orgânica do Centro de Ciências do Mar. Este tipo de fármacos foi seleccionado uma vez que alguns autores defendem que podem ser utilizados no combate a outros patogénicos com um ciclo de vida complexo (Cristiano, 2012; Delves *et al.*, 2012), como é o caso do *Amyloodinium ocellatum*.

Os endoperóxidos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) - um composto muito usado como solvente aprótico e polar em laboratório e na indústria (Vignes, 2000) – e conservados a 4°C. A concentração final, nominal, em milimolar (mM) das soluções-mãe foi de 100 mM (LCD67A, LC50, NAD16, NAD17 e NAD19), 75 mM (LCD95) e 50mM (LCD93 e NAD11). No entanto, devido às suas propriedades fisico-químicas, a dissolução destes fármacos, mesmo em DMSO, é difícil. Assim, e também por uma limitação logística do número de ensaios possíveis e animais necessários, daqueles 8 endoperóxidos fornecidos (tabela 3.2), optou-se por testar apenas os 4 (LCD67A, LCD93, NAD17, NAD19) cuja dissolução ocorreu sem qualquer dificuldade.

Tabela 3.2 – Endoperóxidos fornecidos pelo Grupo de Síntese e Reactividade Orgânica.

Nome	Formula	Estrutura molecular	Massa molecular (g/mol)
LC50	$C_{16}H_{22}O_4$		278,34
LCD67A	$C_{19}H_{28}O_5$		336,42
LCD93	$C_{17}H_{26}O_4$		294,39
LCD95	$C_{17}H_{27}NO_3$		293,4
NAD11	$C_{16}H_{24}O_3$		264,36
NAD16	$C_{20}H_{30}O_5$		350,45
NAD17	$C_{18}H_{26}O_5$		322,40
NAD19	$C_{22}H_{33}NO_4$		377,52

### **3.6. Ensaio *in vitro***

Cada ensaio *in vitro* iniciou-se a partir de um inóculo de concentração conhecida (tomonte/ $\mu\text{L}$ ) de parasita, do qual pipetou-se 200  $\mu\text{l}$  de amostra para uma placa de 96 poços. A placa de poços foi colocada à temperatura ambiental do laboratório, controlada para 24°C, no interior numa câmara com entrada de ar atmosférico e contendo água destilada no fundo de forma a reduzir a evaporação nos poços.

Os tomontes incubados foram examinados diariamente usando um microscópio Olympus CH2 e o número de tomitos por tomonte (t/T) registado. Os ensaios continuaram à temperatura ambiente e a uma salinidade de 33 ppt até se observar o estado de dinosporo em pelo menos um dos poços.

#### **3.6.1. Observação do ciclo de vida do parasita**

Na primeira parte dos ensaios *in vitro* observou-se o ciclo de vida do parasita de um inóculo que após o isolamento foi incubado numa placa de poços à temperatura ambiente e de outro inóculo que esteve 1 dia a 4°C, com o objectivo de observar se existem diferenças no ciclo de vida do parasita quando os inóculos com parasita após isolamento são armazenados a baixas temperaturas. Foram adicionados 0,5ml de água salgada não esterilizada a cada um dos inóculos de 1ml de parasita e seguidamente distribuídos em triplicado numa placa de poços. O início da monitorização do ciclo de vida do parasita foi às 36 h após a inoculação e depois passadas 4h e 12h até às 76h, pipetando 3 amostras de cada poço em cada contagem.

Na monitorização do ciclo de vida do parasita realizou-se uma classificação ao seu ciclo de vida (tabela 3.3), optando-se por acrescentar estados intermédios entre as divisões do tomonte pois durante os ensaios *in vitro* observou-se que a divisão dos tomitos dentro do tomonte não era sincronizada. Para além disso, -aplicou-se um índice de desenvolvimento do parasita, através da utilização de uma pontuação para cada estado do ciclo de vida do parasita (tabela 3.3). O valor final do índice corresponde à soma dos produtos da frequência de células contadas nas três pipetagens para cada estado de desenvolvimento do parasita pela pontuação dada a cada estado. Esta abordagem é semelhante a outras previamente utilizadas noutros estudos sobre a saúde de peixes (Landsberg *et al.*, 1998), e permite a comparação dos efeitos dos vários fármacos e diferentes concentrações sobre o desenvolvimento.

Tabela 3.3 – Classificação do estado do ciclo de vida do parasita.

Estado do ciclo de vida da célula	Características	Pontuação
II dinosporos	Célula com a morfologia de um dinoflagelado com dois flagelos	12
∞ tomit final	Tomito com a capsula lisada	11
■ 32t/T	Tomonte na 6 <sup>a</sup> divisão com 32 tomitos	10
※ 17-31t/T	Tomonte entre a 5 <sup>a</sup> e a 6 <sup>a</sup> divisão	9
▲ 16t/T	Tomonte na 5 <sup>a</sup> divisão com 16 tomitos	8
✎ 9-15t/T	Tomonte entre a 4 <sup>a</sup> e a 5 <sup>a</sup> divisão	7
▼ 8t/T	Tomonte na 4 <sup>a</sup> divisão com 8 tomitos	6
※ 5-7t/T	Tomonte entre a 3 <sup>a</sup> e a 4 <sup>a</sup> divisão	5
■ 4t/T	Tomonte na 3 <sup>a</sup> divisão com 4 tomitos	4
↘ 3t/T	Tomonte entre a 2 <sup>a</sup> e a 3 <sup>a</sup> divisão	3
■ 2t/T	Tomonte na 1 <sup>a</sup> divisão	2
※ 1t/T	Tomonte que não sofreu divisão	1

### 3.6.2. Exposição aos endoperóxidos

Os 4 endoperóxidos seleccionados foram testados em diferentes concentrações (Tabela 3.4) sob a divisão dos tomontes. Cada fármaco foi testado em triplicado e comparado com um conjunto triplicado de controlo não tratado e outro tratado com solvente. O volume de solvente (dimetilsulfóxido) testado em poços com 200µl de solução contendo parasitas foi igual ao volume máximo de endoperóxido utilizado nesse ensaio (tabela 3.4) de modo a verificar se o solvente tem influência na divisão do parasita.

Tabela 3.4 – Doses (mM) de endoperóxidos e volumes de DMSO (µl) testados.

Endoperóxido	Concentração (mM)	Volume de DMSO (µl)
NAD17	0,1	2
	1	2
	2	1
NAD19	0,01	20
	0,05	20
	0,1	20
	0,25	20
	1	2
	2	1
LCD93	0,1	4
	1	40
LCD67A	1	2
	2,5	5



dissolvido em DMSO) foi novamente dissolvido em 30ml de etanol 100% e vaporizado sobre um tabuleiro contendo ração usando um pulverizador. A preparação da ração realizou-se semanalmente.

A percentagem de alimento fornecido foi de 2% do peso médio vivo dos peixes para cada aquário.

O período de exposição ao tratamento foi de 42 dias, com o objectivo de verificar palatabilidade, mortalidade e eficácia do tratamento.

### **3.7.2. Circuito experimental**

O ensaio *in vivo* foi realizado em sistema de circuito fechado, composto por 24 aquários de plástico com capacidade de 120L, dispostos em paralelo (figura 3.2). O sistema existente na piscicultura funciona em duplicado, ou seja, existem dois tanques aos quais se aplica o mesmo tratamento. Cada aquário comunicava com um aquário mais pequeno disposto ao lado que continha um escumador, um sistema de bombagem de água e um sistema de filtragem mecânica (manta acrílica) e biológica (biobolas).

Antes de entrar no sistema, a água foi bombeada da Ria de Alvor para reservatórios, junto ao laboratório, onde a água é filtrada mecanicamente e desinfectada com ozono e UV.

Devido ao sistema funcionar em circuito fechado, verificou-se uma acumulação de detritos orgânicos provenientes dos restos de alimento e do próprio metabolismo do peixe, deste modo a água foi renovada a 100% até ao 15º dia, a partir do qual a renovação da água passou a ser de 40% pois a qualidade da água é importante para o *Amyloodinium* infectar os peixes (Pereira *et al.*, 2011).

O arejamento e o fotoperíodo foram mantidos constantes ao longo de todo o ensaio em todos os tanques. A iluminação foi garantida por lâmpadas flora fluorescente tubular, dispostas no tecto da sala, de modo a abranger todo o circuito experimental.

A temperatura da sala foi controlada por um aparelho de ar condicionado junto à entrada da sala de ensaio. Ao 25º dia de ensaio foram distribuídos dinoflagelados pelos 12 primeiros tanques e a temperatura foi aumentada de 21°C para 26°C, para potenciar a infecção do parasita.



Figura 3.2 – Circuito experimental.

### 3.7.3. Animais-alvo

Para o ensaio in vivo foram utilizados 360 juvenis de douradas provenientes de uma maternidade de França, com um peso inicial de  $18,58 \pm 3,27$  g (média  $\pm$  D.P). Os animais foram lavados em água doce e alguns amostrados para garantir que os mesmos não se encontravam infectados com *A. ocellatum*.

Após a pesagem foram distribuídos 15 peixes por aquário pelos 24 aquários do ensaio. Tiveram um período de aclimatização para se adaptarem às condições experimentais (tipo de alimentação, regime alimentar, qualidade da água, fotoperíodo, densidade e manutenção dos tanques) de 13 dias.

No início do ensaio, os peixes foram alimentados duas vezes por dia com uma ração comercial “AquaGold 5” 2 mm (Aquasoja, SORGAL, S.A., Ovar, Portugal) a uma taxa de 3% do peso vivo médio do peixe. Ao fim de 12 dias os peixes passaram a ser alimentados com ração tratada (tabela 3.5) a uma taxa de 2% do peso vivo médio dos peixes em cada tanque.

Os peixes mortos, foram removidos do tanque, dissecados e inspeccionados para confirmar se se encontravam infectados com *A. ocellatum* (Masson *et al.*, 2011).

Tabela 3.5 – Tratamento por tanque.

Composto	Tanques
Controlo	1;2;13;14
DMSO	3;4;15;16
NAD19	5;6;17;18
NAD17	7;8;19;20
LCD93	9;10;21;22
LCD67A	11;12;23;24

#### 3.7.4. Infecção dos animais-alvo

Os dinosporos utilizados no ensaio *in vivo* foram os obtidos do isolamento de dia 15-09-2012 (tabela 3.1). Após o isolamento, descrito anteriormente, os tomontes foram colocados num frasco com um volume de água salgada artificial de 24 ml. Os tomontes foram incubados a 26 °C e 35 ppt durante 72h, tempo aproximado que o parasita atinge o estado de dinosporo (Oestmann e Lewis, 1995). Todos os dias foi pipetado 1 µl do volume de água contendo o parasita para uma lâmina e observado ao microscópio com o objectivo de acompanhar o desenvolvimento do parasita e obter a concentração aproximada de dinosporos. Após as 72 h, foram distribuídos por 12 tanques, 2 ml da suspensão de dinosporos ( $\pm 667$  dinosporos). De modo a detectar a presença do parasita, após 5 dias de se ter realizado a infecção, foi cuidadosamente examinado um peixe por tanque através de raspagem do tegumento e observada sob luz do microscópio.

#### 3.7.5. Amostragem biológica

Realizaram-se duas amostragens, a primeira foi realizada ao 7º e 8º dias de infecção com dinosporos amostrando-se 6 peixes, enquanto a segunda realizada ao 18º dia amostraram-se os restantes peixes.

Em ambas as amostragens, o volume da água do tanque foi reduzido para 50 % do volume total e os peixes capturados com um camaroeiro. Os animais não foram anestesiados pois poderia haver falsos negativos (Floyd e Floyd, 2011).

Após a pesagem, foram recolhidos 300 µl de sangue de 4 peixes por punção caudal com seringas de 1 ml heparinizadas e seguidamente sacrificados por corte da coluna. O sangue recolhido foi colocado em tubos *ependorf*, devidamente identificados. O plasma sanguíneo foi separado por centrifugação (11500g) e colocado em tubos *ependorf* identificados e imediatamente congelados.

A todos os peixes amostrados foram cortados filamentos do segundo arco branquial aos quais se adicionou água salgada a 33ppt. A lâmina montada com filamentos branquiais foi observada sob a luz do microscópio BMS - E1, anotou-se o número de trofontes em 20 filamentos a uma ampliação 100x.

Na segunda amostragem foi retirado um arco branquial com uma tesoura de pontas finas de 3 peixes de tanques que não receberam tratamento e de peixes que receberam o fármaco NAD19. Cada arco branquial foi colocado num tubo *ependorf* identificado com tampão SEI (150 mM sacarose, 10 mM EDTA, 50 mM imidazole, pH 7.3) e congelado para posterior medição da actividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase.

Foram ainda amostrados 5 peixes de 3 tanques de terra com animais que recuperaram de infecção de *A. ocellatum*, peixes que nunca foram infectados e peixes infectados. O plasma recolhido destes peixes foi congelado em azoto líquido a -80°C.

O transporte das amostras da piscicultura até ao laboratório de Fisiologia Adaptativa e Bioquímica do Grupo de Investigação em Endocrinologia Comparativa e Molecular do CCMAR foi efectuado em caixas isotérmicas de transporte de peixe com gelo em escamas.

### **3.7.6. Análises bioquímicas**

O plasma é uma fracção de fluido de sangue que contém sais e proteínas dissolvidas que fornecem dados sobre o bem-estar animal. As análises bioquímicas realizadas ao plasma foram: medição da osmolaridade, quantificação do cloro, glucose, proteína e cortisol, e aos arcos branquiais medição da actividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase.

As amostras recolhidas foram descongeladas no dia das análises.

#### **3.7.6.1. Análises ao plasma**

Os níveis de cortisol no plasma foram determinados pelo radioimunoensaio (RIA) descrito por Rotllant e os seus colaboradores (2005). As amostras de plasma foram diluídas

em tampão SEI e desnaturadas a 70°C durante 30 minutos. Preparou-se a curva-padrão através de uma concentração conhecida de cortisol. Pipetou-se 100 µl de amostra em duplicado, adicionou-se 100 µl de solução anticorpo/marcador ( $[^3\text{H}]$ -cortisol+anticorpo+tampão gelatina) e incubou-se a 4°C durante a noite. Após incubação adicionou-se 250 µl de carvão activado com excepção do tubo total (indica a actividade total em cada tubo), sempre sobre gelo sem ultrapassar 12 minutos entre a primeira e a última amostra. Centrifugou-se a 2000 rpm durante 12 minutos a 4°C e o sobrenadante transferiu-se para tubos de cintilação aos quais se adicionou 4 ml de líquido de cintilar.

A medição da osmolaridade do sangue providência informação funcional e essencial para entender o estado de osmorregulação do peixe (Bodinier *et al.*, 2010), tendo sido medida num osmómetro de pressão de vapor (WESCOR 5520).

A concentração de proteína no plasma foi determinada pela diluição do plasma 1:40 e medição da concentração de proteína usando uma variante em “kit” comercial (BIORAD) do método Bradford (1976) adaptado a placa de 96 poços. A curva padrão foi realizada com uma concentração conhecida de albumina de soro bovino (BSA) (2mg/ml) e a absorbância lida a 595 nm.

A quantificação da glucose e do cloro foi medida com kits comerciais de Spinreact (Sant Esteve de Bas, Espanha) adaptados a placas de 96 poços. Para ambos preparou-se a curva-padrão através de uma concentração conhecida de glucose (20 mM) e cloreto de sódio (200 mM). Pipetou-se 2,5 µl de cada concentração da curva-padrão em triplicado, do padrão do kit e das amostras em duplicado. Aos poços adicionou-se 250 µl de reagente e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Através do espectrofotómetro leu-se a absorbância a 505 nm para a glucose e a 480 nm para o cloro. O declive da curva-padrão permitiu calcular a concentração de cada composto em mmol/L.

### **3.7.6.2. Medição da actividade $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ - ATPase nas brânquias**

A actividade de  $\text{Na}^+$  /  $\text{K}^+$  ATPase das brânquias foi determinada segundo o método McCormick (1993) adaptado para peixes não-salmonídeos. Após descongelar, cortou-se uns três filamentos branquiais e homogeneizou-se em 125 µl de tampão SEI. A mistura foi centrifugada a 5000g durante 2 minutos a 4°C. Pipetou-se 10 µl dos homogeneizados em quadruplicado para uma placa de 96 poços. Cada amostra tinha 2 poços contendo uma mistura

com oubaina (0,5 mM) e outros 2 contendo uma mistura sem oubaina, um inibidor específico da actividade de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase. Mediu-se cineticamente durante 10 minutos a 25°C e a um comprimento de onda de 340 nm num espectrofotometro.

A actividade ATPase foi detectada por acoplamento enzimático de desfosforilação de ATP para a oxidação de NADH e expressa em  $\mu\text{mol ADP mg prote\u00edna}^{-1} \text{ hora}^{-1}$  (Laiz-Carri\u00f3n *et al.*, 2005).

### 3.8. An\u00e1lise estat\u00edstica

Para cada tratamento foi calculada a abund\u00e2ncia m\u00e9dia, a taxa de preval\u00eancia de parasitas nas br\u00e2nquias adaptado de Bush *et al* (1997) e a efic\u00e1cia adaptada de Stone *et al.*, (2000), como se segue:

- Abund\u00e2ncia m\u00e9dia = (n\u00famero total de parasitas observados em 20 filamentos branquiais/n\u00famero de peixes examinados);
- Taxa de preval\u00eancia (%) = (n\u00famero peixes parasitados/ n\u00famero de peixes examinados) x 100;
- % Efic\u00e1cia= 100 – (100 x (m\u00e9dia da abund\u00e2ncia de parasitas no grupo de tratamento/medida da abund\u00e2ncia de parasitas no grupo de controlo)).

As diferen\u00e7as estatisticamente significativas entre infectados e n\u00e3o infectados para o mesmo tratamento e amostragem foram estadas atrav\u00e9s do teste t-Student. Utilizou-se ainda o teste t-Student para verificar diferen\u00e7as estatisticamente significantes entre infectados/n\u00e3o infectados do mesmo tratamento entre amostragens. Para averiguar se existiam diferen\u00e7as significativas entre tratamentos para infectados/n\u00e3o infectados na mesma amostragem aplicou-se uma an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA) em ranks seguindo-se o teste Kruskal-Wallis para a osmolaridade, glucose e prote\u00edna e para o cloro foi atrav\u00e9s de uma ANOVA de um factor. Atrav\u00e9s do teste de Pearson testou-se a rela\u00e7\u00e3o entre o n\u00famero de trofontes observados em 20 filamentos branquiais para cada uma das medi\u00e7\u00f5es realizadas ao plasma. Todos os procedimentos estat\u00edsticos foram efectuados nos programas inform\u00e1ticos Microsoft Excel® e SigmaPlot v.15 para Windows, para um n\u00edvel de signific\u00e2ncia de 5%.

## **4. Resultados**

A apresentação dos resultados foi elaborada em três partes. A primeira parte apresenta os resultados dos isolamentos, enquanto a segunda e terceira parte apresenta os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

### **4.1. Isolamentos**

Para o diagnóstico da infecção foi necessário realizar biópsias às brânquias pois os peixes utilizados para realizar isolamentos raramente revelaram sinais clínicos associados à amiloidinose.

Em contacto com água destilada o parasita retraiu os rizóides e formou uma célula encapsulada (tomonte). Nos primeiros minutos após serem transferidos para água salgada filtrada, ocorreu contracção do citoplasma da membrana celular. A maioria dos isolamentos realizados foram utilizados para iniciar ensaios *in vitro* (tabela 4.1). Quando o inóculo não era totalmente utilizado no ensaio *in vitro*, utilizou-se para contaminar peixes. Vários isolamentos foram fracassados devido à morte dos animais ou ao reduzido número, por vezes zero, de tomontes isolados.

Tabela 4.1 – Isolamento do parasita, quantidade isolada e utilização.

Isolamento	Nº tomontes/ $\mu$ l	Utilização
13-01-2012	0	-
25-01-2012	13	Ensaio <i>in vitro</i>
28-01-2012	10	Ensaio <i>in vitro</i>
04-02-2012	0	-
24-04-2012	24	Ensaio <i>in vitro</i>
28-04-2012	8	Ensaio <i>in vitro</i>
04-05-2012	3	Infecção de outros peixes
10-05-2012	6	Ensaio <i>in vitro</i>
17-05-2012	3	Infecção de outros peixes
23-05-2012	6	Ensaio <i>in vitro</i>
04-06-2012	8	Ensaio <i>in vitro</i>
18-06-2012	1	Infecção de outros peixes
13-07-2012	7	Ensaio <i>in vitro</i>
21-07-2012	34	Ensaio <i>in vitro</i>
29-07-2012	7	Ensaio <i>in vitro</i>
12-09-2012	3	Ensaio <i>in vivo</i>

## 4.2. Ensaio *in vitro*

### 4.2.1. Observação do ciclo de vida do parasita

A divisão do parasita iniciou-se primeiro no inóculo que não esteve a 4°C (figura 4.2 a e b). Nesse inóculo (figura 4.2 a), observaram-se as primeiras divisões às 36h após o início do isolamento e atingiu o último estado de divisão (32t/T) às 72h. Enquanto no inóculo que esteve 1 dia a 4°C as primeiras divisões observaram-se às 68h (figura 4.2 b) e o estado de divisão mais avançado que se observou foi 8 t/T.

Neste ensaio, os tomitos dividiram-se por fissão binária em completa sincronização dentro do tomonte. No entanto, a divisão dos tomites não foi sincronizada em ambos os inóculos.

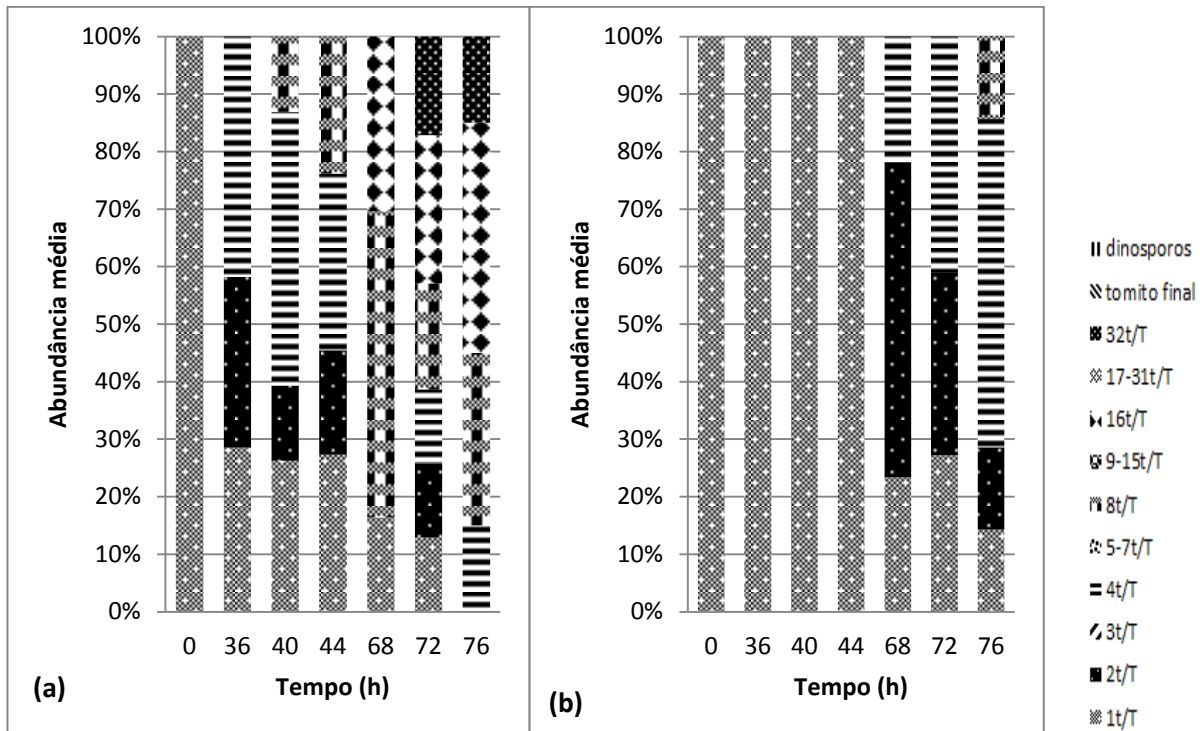


Figura 4.2 – Abundância relativa do estado do parasita ao longo do tempo quando não esteve a 4°C (a) e quando esteve 1 dia a 4°C (b) (n = variável). Consultar tabela 3.3.

O valor do índice de desenvolvimento do parasita (figura 4.3) aumenta ao longo do tempo e com valores mais elevados em parasitas que não estiveram a 4°C, enquanto em parasitas que estiveram 1 dia a 4°C mantém-se estável nas primeiras 44 horas e com valores mais baixos.

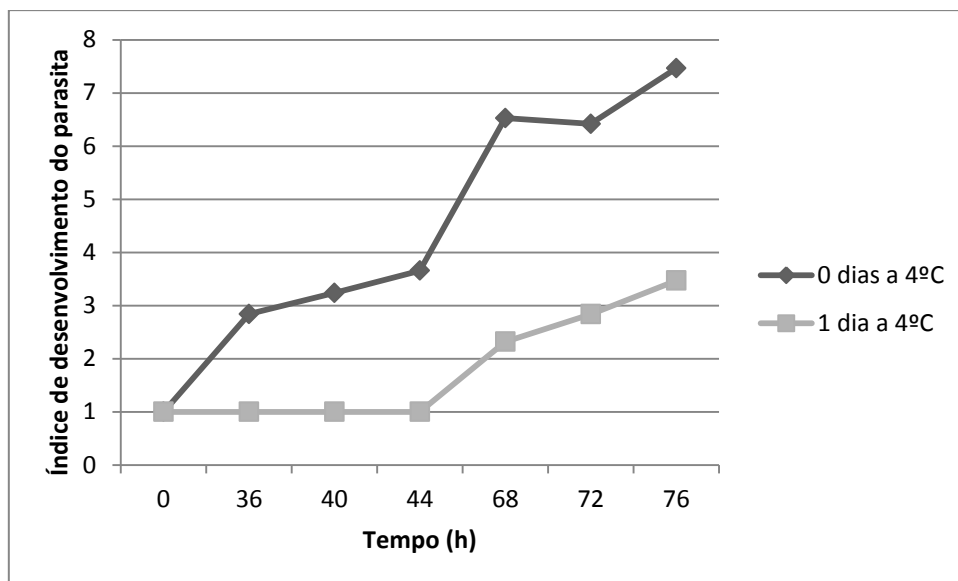


Figura 4.3 - Índice de desenvolvimento do parasita ao longo do tempo quando não esteve a 4°C e quando esteve 1 dia a 4°C.

## 4.2.2. Exposição aos endoperóxidos

### 4.2.2.1. Abundância relativa do parasita

Na generalidade, as células dos grupos de controlo de cada ensaio de exposição de células de *A. ocellatum* a endoperóxidos, encontravam-se em estados mais avançados de divisão que as células expostas a DMSO e/ou a um endoperóxido (figura 4.4, 4.5 e 4.6). Além disso a maioria das células observadas tanto nos controlos como nos tratamentos, às 24 e 48 horas estavam no estado 1t/T (não ocorreu divisão).

Não se observou divisão às 24 e 48 horas nos seguintes poços: 0,1mM NAD19 (figura 4.4 a), 1mM LCD93 (figura 4.5 c) e DMSO dos ensaios com LCD93 a 1mM (figura 4.5 c) e 2,5mM (figura 4.6 c).

Em geral, das 24 para as 48h observaram-se estados de divisão mais avançados, com exceção para os ensaios de 1mM de NAD17 e NAD19 nos quais às 48h apenas se observaram células que não tinham sofrido divisão (1t/T) (figura 4.5).

Observaram-se estados mais avançados de divisão nos poços expostos a 2mM NAD19 que nas restantes doses testadas do fármaco.

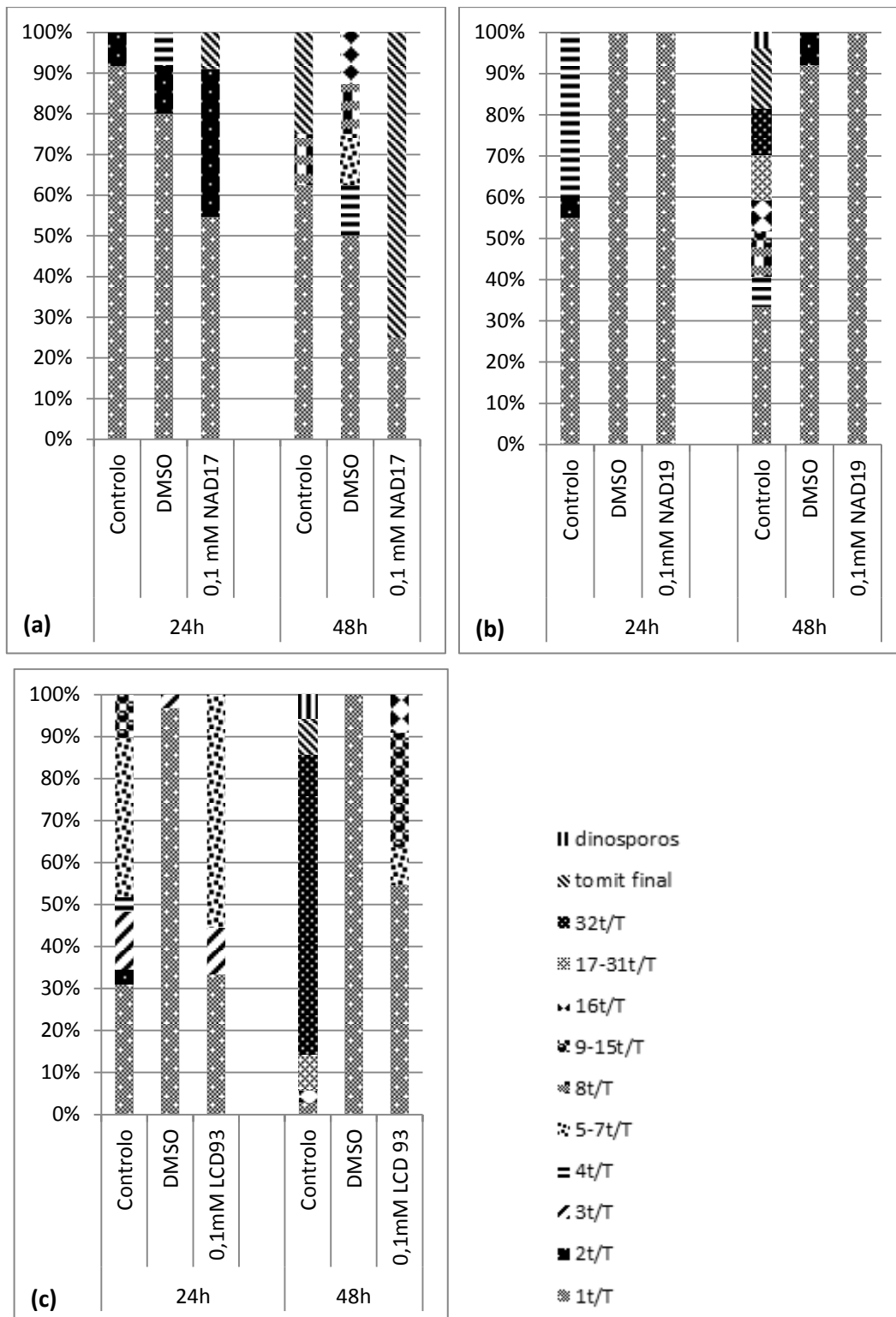


Figura 4.4 – Abundância relativa do estado do parasita comparando o controlo, solvente e endoperóxido a 0,1mM de NAD17 (a), NAD19 (b) e LCD93 (c) às 24h e às 48h (n = variável). Consultar tabela 3.3.

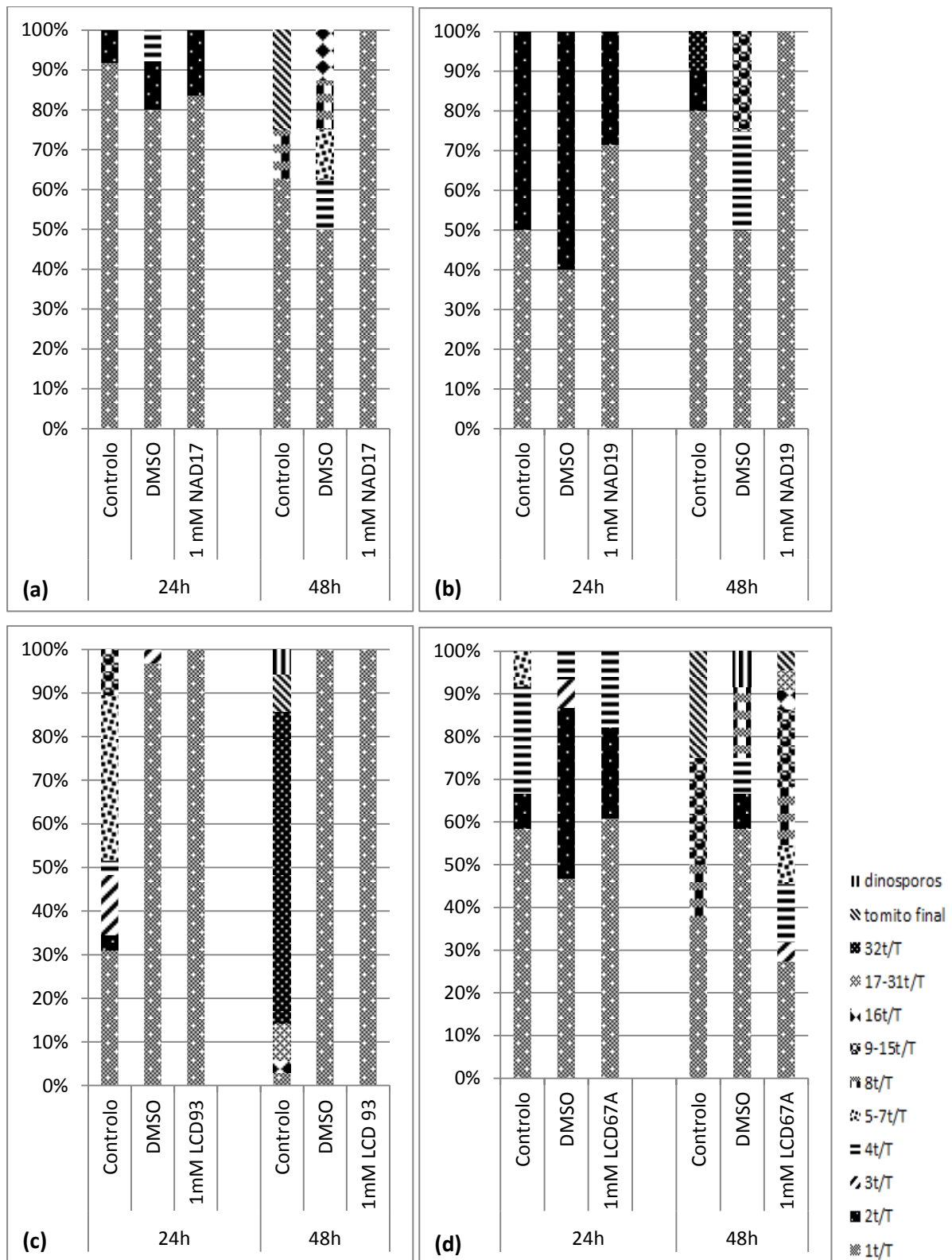


Figura 4.5 – Abundância relativa do estado do parasita comparando o controle, solvente e endoperóxido a 1mM de NAD17 (a), NAD19 (b), LCD93 (c) e LCD67A (d) às 24h e às 48h (n = variável). Consultar tabela 3.3.

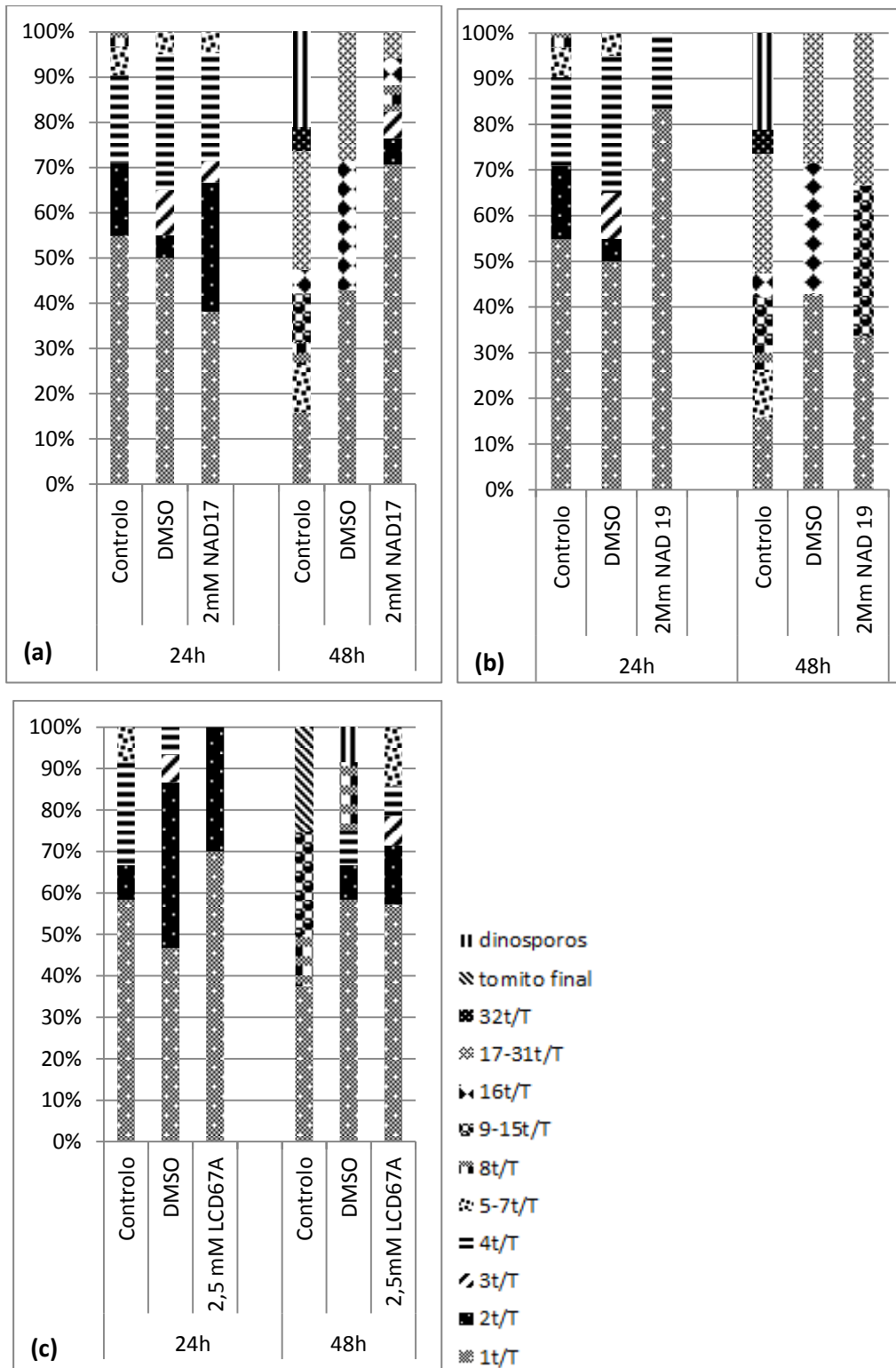


Figura 4.6 – Abundância relativa do estado do parasita comparando o controlo, solvente e endoperóxido a 2 e 2,5mM de NAD17 (a), NAD19 (b) e LCD67A (c) às 24h e às 48h (n = variável). Consultar tabela 3.3.

### 4.2.3. Índice de desenvolvimento do parasita

O índice de desenvolvimento do parasita tem geralmente valores menores quando o parasita é exposto a doses menores e tende a aumentar das 24 para as 48 horas (figura 4.7 a, b, c e d), com exceção para o NAD19 a 2mM (figura 4.7 b).

O NAD 19 a 0,1mM (figura 4.7 b) foi o único endoperóxido que mantiveram o índice de desenvolvimento de 1 das 24 para as 48 horas. O endoperóxido com um maior índice de desenvolvimento foi o NAD17 a 0,1mM (figura 4.7 a).

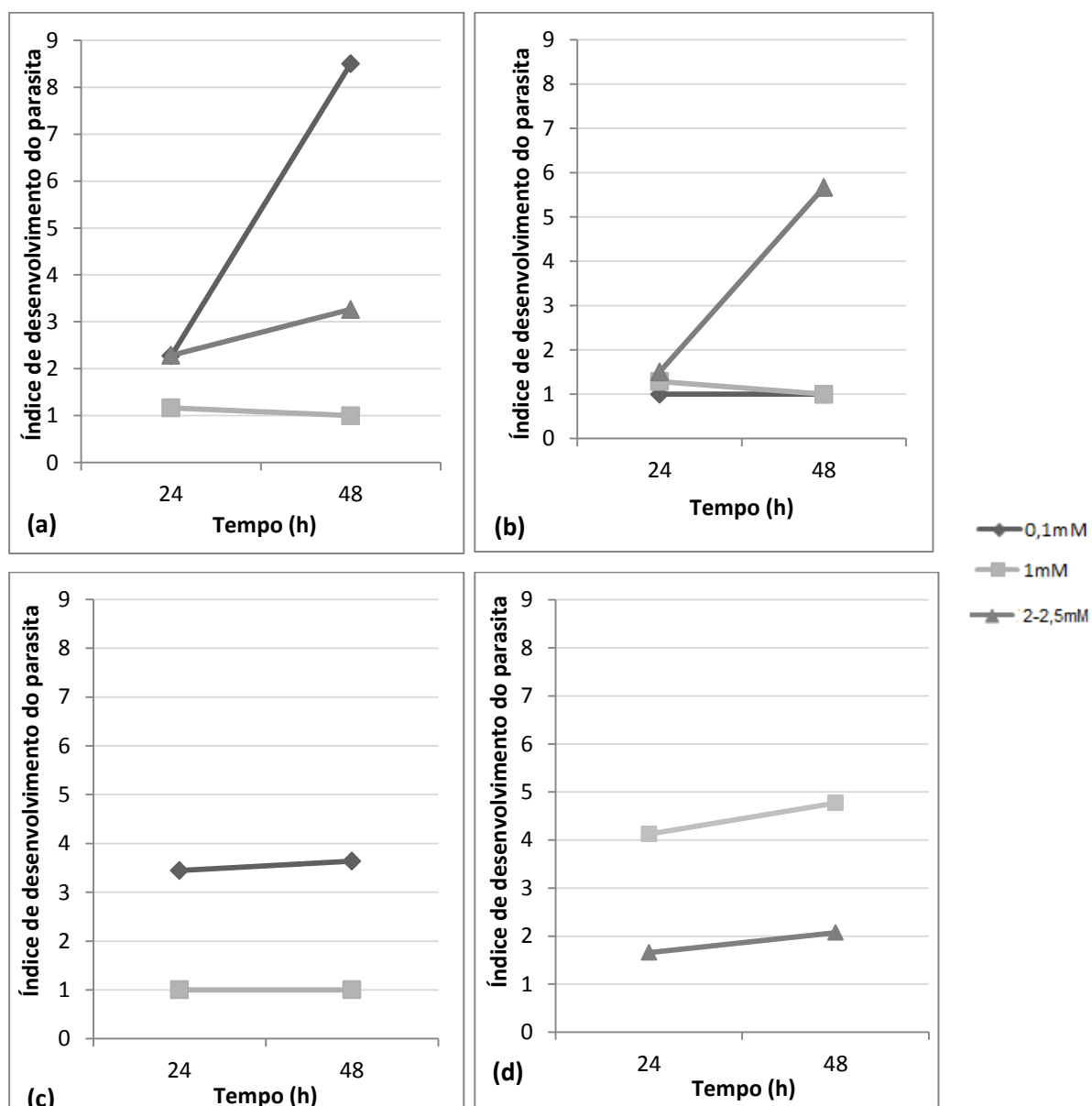


Figura 4.7 - Índice de desenvolvimento do parasita quando exposto a NAD17 (a), NAD19 (b), LCD93 (c) e LCD67A (d) a diferentes concentrações às 24 e 48 horas.

Os valores do índice de desenvolvimento de todas as concentrações testadas de NAD19 encontram-se representados na figura 4.8, onde é possível observar que os valores às 24h são iguais às das 48h com exceção das concentrações de 1 e 2mM.

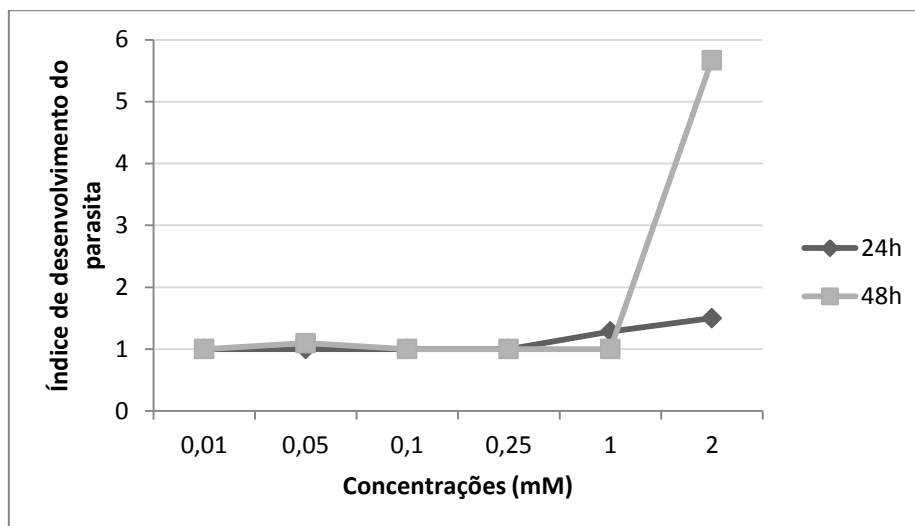


Figura 4.8 – Índice de desenvolvimento do parasita quando exposto a NAD19 a diferentes concentrações às 24 e 48 horas.

O quociente do índice de desenvolvimento do parasita do NAD19 e do respectivo controlo para cada dose (figura 4.9) é muito próximo para as concentrações 0,01; 0,05; 0,1 e 0,25 aumentando na concentração 1mM e 2mM tanto às 24 como às 48 horas. Com exceção da concentração 2mM o quociente é superior às 24 horas.

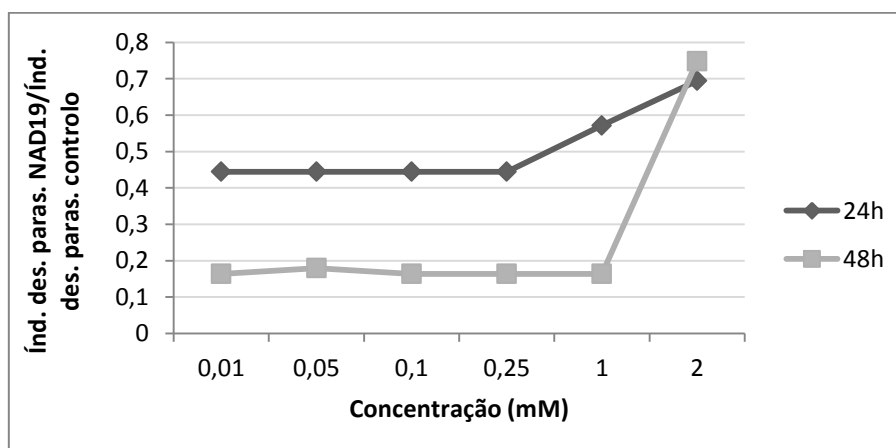


Figura 4.9 – Quociente do Índice de desenvolvimento do parasita do NAD19 e do respectivo índice do controlo às 24h e 48h.

### **4.3. Ensaio in vivo**

#### **4.3.1. Animais**

Durante o período de aclimatização morreu uma dourada em cada um dos seguintes aquários: 3 (DMSO), 19 (NAD17) e 22 (LCD93). Quanto à ingestão de alimento durante o período de aclimatização dos animais à ração tratada com uma dose de 10µmol/kg, não se observou regurgitação da ração nem sinais de toxicidade (por exemplo, natação errática ou perda de equilíbrio).

Após o início da infecção, as douradas ingeriram sempre toda a ração fornecida com exceção das douradas do aquário 10 (LCD93) que ao 33º, 34º e 35º dia ingeriram cerca de 80% da ração fornecida.

#### **4.3.2. Infecção**

O exame microscópico óptico das preparações a fresco de esfregaços da pele, realizados ao 5º dia após a infecção, permitiu identificar morfológicamente o estado trofante do *A. ocellatum* e observar que as douradas pertencentes ao grupo “não infectados” encontravam-se infectadas. No entanto, optou-se por manter a classificação como “infectados” e “não infectados”, para analisar se existiam diferenças entre as douradas que foram infectadas de acordo com o protocolo e as que foram contaminadas.

A maioria dos trofontes observados eram de pequena dimensão e de coloração clara.

Observaram-se menos trofontes nas douradas que receberam tratamento NAD17 e NAD19 na 1ª amostragem (figura 4.10 a) e nas que receberam DMSO e LCD67A na 2ª amostragem (figura 4.10 b). Por outro lado, foi nas douradas que receberam tratamento oral LCD93 (figura 4.10 a e b) em que se observaram maior número de trofontes nos 20 filamentos branquiais observados.

As douradas infectadas com *A. ocellatum* tinham um maior número de parasitas, com exceção na 1ª amostragem (figura 4.10 a) para as que receberam tratamento oral NAD17 e na 2ª amostragem (figura 4.10 b) as que receberam tratamento oral LCD93.

Apenas na 2ª amostragem (figura 4.10 b) existe diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controlo das douradas não infectadas e as que receberam os tratamentos com

NAD17, NAD19 e LCD67A, nos quais o número médio de parasitas é menor que o do controle.

Da 1ª para a 2ª amostragem há uma redução do número de parasitas observados em todos os grupos.

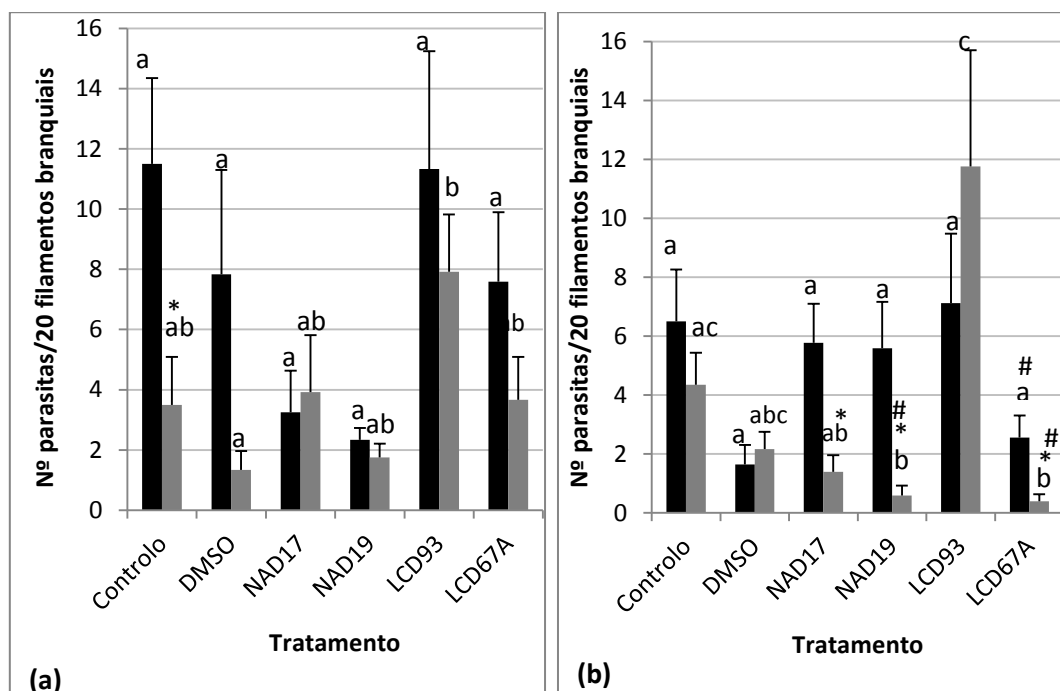


Figura 4.10 – Abundância média (número total de parasitas observados em 20 filamentos branquiais/número de peixes examinados) de douradas infectadas (■) e não infectadas (■) com *A. ocellatum* em diferentes tratamentos na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias ± erro-padrão (n 1ª amostragem = 12; n 2ª amostragem = 17-18).

Letras diferentes - Indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos em peixes infectados ou não infectados (ANOVA de um factor);

\*- Indica diferença estatisticamente significativa entre infectados e não infectados no mesmo tratamento (teste t-Student);

# - Indica diferença estatisticamente significativa entre a 1ª e 2ª amostragem para o mesmo tratamento e grau de infecção (teste t-Student).

Apesar de na 1ª amostragem o número de parasitas em 20 filamentos branquiais ser menor nas douradas tratadas com NAD19 (figura 4.10 a), os peixes infectados que receberam este tratamento tinham uma prevalência branquial de 100% (fig. 4.11 a).

A prevalência do parasita nas brânquias (figura 4.10 a e b) foi de modo geral maior nos peixes infectados e diminuindo da 1ª para a 2ª amostragem.

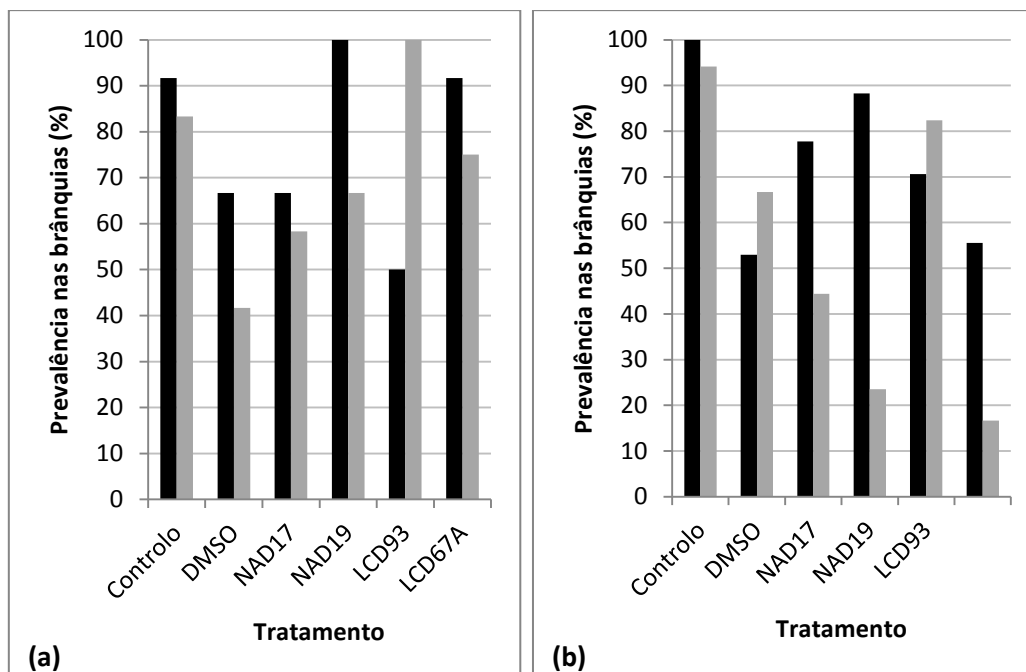


Figura 4.11 – Prevalência ((número peixes parasitados/ número de peixes examinados) x 100) nas brânquias em douradas infectadas (■) e não infectadas (■) com *A. ocellatum* submetidas a diferentes tratamentos orais na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n 1ª amostragem = 12; n 2ª amostragem = 17-18).

Em relação à eficácia dos tratamentos existiu uma grande variabilidade para o mesmo tratamento comparando a eficácia do tratamento nas douradas infectadas com as não infectadas e da 1ª para a 2ª amostragem (figura 4.12 a e b), apenas o DMSO, o qual não é considerado tratamento mas sim o controlo do solvente, registou valores mais próximos de eficácia tanto em relação ao tipo de infecção como entre amostragens. Quanto ao endoperóxido menos eficaz foi o LCD93.

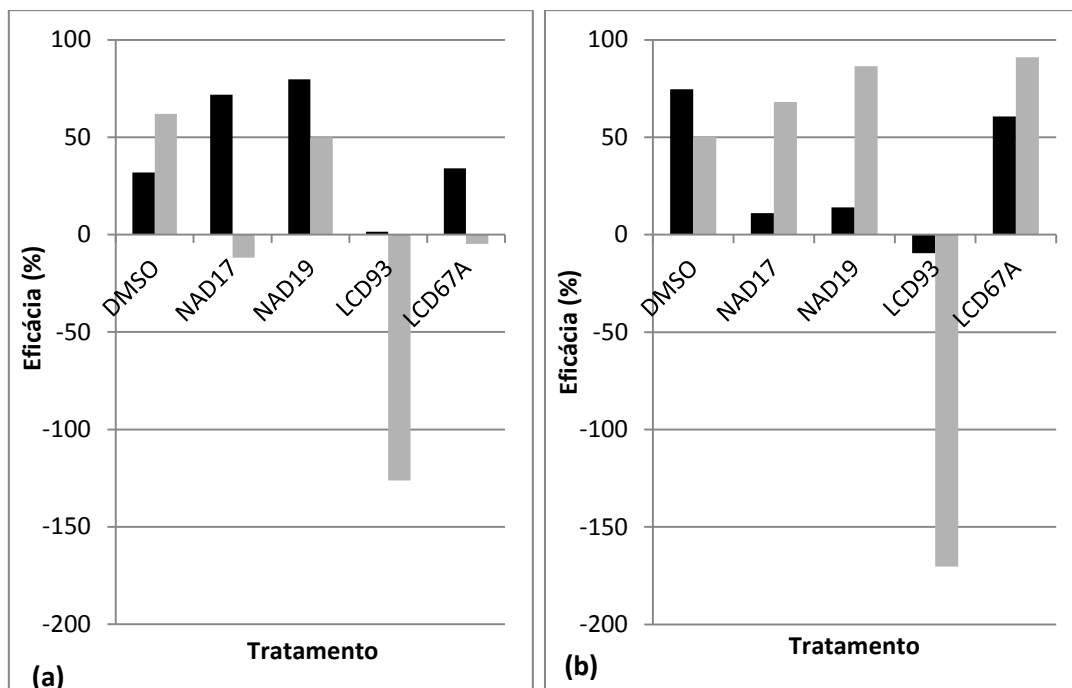


Figura 4.12 – Eficácia (%) ( $100 - (100 \times (\text{média da abundância de parasitas no grupo de tratamento}/\text{média da abundância de parasitas no grupo de controlo}))$ ) dos tratamentos em douradas infectadas (■) e não infectadas (■) com *A. ocellatum* na 1ª e 2ª amostragem. n=12 (1ª amostragem) e n=17-18 (2ª amostragem) (n 1ª amostragem = 12; n 2ª amostragem = 17-18).

Na dose testada nenhum dos endoperóxido conseguiu eliminar completamente o parasita (figura 4.10 e 4.11) e obter uma eficácia de 100% (figura 4.12).

### 4.3.3. Metabolitos

No ensaio preliminar no qual se recolheu sangue de peixes que se encontravam infectados, que tinham recuperado e outros que nunca tinham estado em contacto com o parasita (nãive) e se mediu o nível de cortisol não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (figura 4.13).

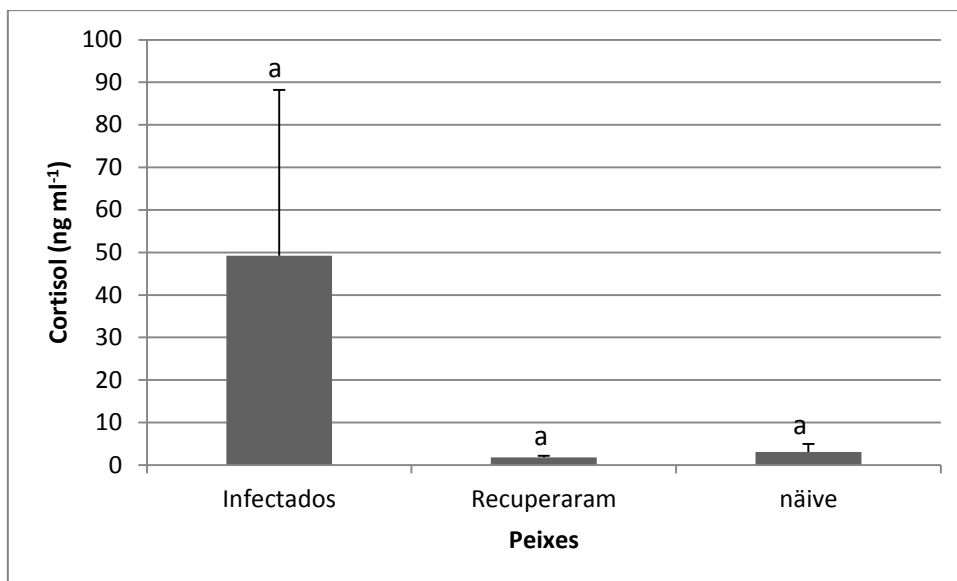


Figura 4.13 – Níveis de cortisol ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) em plasma sanguíneo de diferentes grupos de peixes expostos ao parasita. Os valores são as médias  $\pm$  erro-padrão ( $n = 5$ ).

Não existe diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (ANOVA de um factor).

Relativamente ao ensaio *in vivo*, na 1<sup>a</sup> amostragem (figura 4.14 a) não existe diferença estatisticamente significativa dos níveis de cortisol entre tratamentos, no entanto as douradas que receberam o tratamento oral LCD67A foram as que tiveram níveis de cortisol ligeiramente mais elevados ( $\pm 40 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Já na 2<sup>a</sup> amostragem (figura 4.14 b) douradas não infectadas e tratadas com DMSO e as infectadas tratadas com NAD19, LCD93 e LCD67A tinham níveis mais elevados de cortisol (superior a  $40 \text{ ng ml}^{-1}$ ) que as restantes douradas.

As concentrações plasmáticas de cortisol apresentaram uma grande variabilidade, o que dificultou a análise e interpretação dos resultados.

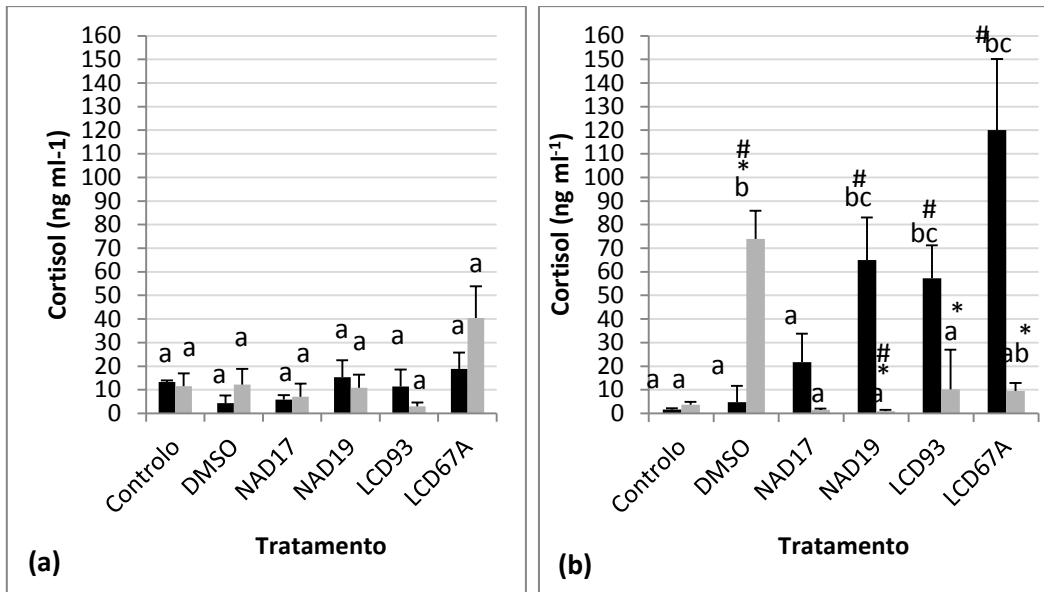


Figura 4.14 – Níveis de cortisol (ng ml<sup>-1</sup>) em plasma de douradas infectadas (■) e não infectadas (■) com *A. ocellatum* expostas a diferentes tratamentos na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 8).

Letras diferentes - Indicam diferenças estatisticamente significativa (P<0,05) entre tratamentos em peixes infectados e não infectados (ANOVA de um factor);

\*- Indica diferença estatística significativa no mesmo tratamento entre infectados e não infectados (teste t-Student);

# - Indica diferença estatística significativa entre a 1ª e 2ª amostragem no mesmo tratamento e infecção (teste t-Student).

Pela análise da figura 4.15 a e b, não existe relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de cortisol (ng ml<sup>-1</sup>) em plasma de douradas infectadas e não infectadas tanto na 1ª como na 2ª amostragem, comprovado pelo teste de correlação de Pearson (p<0,05).

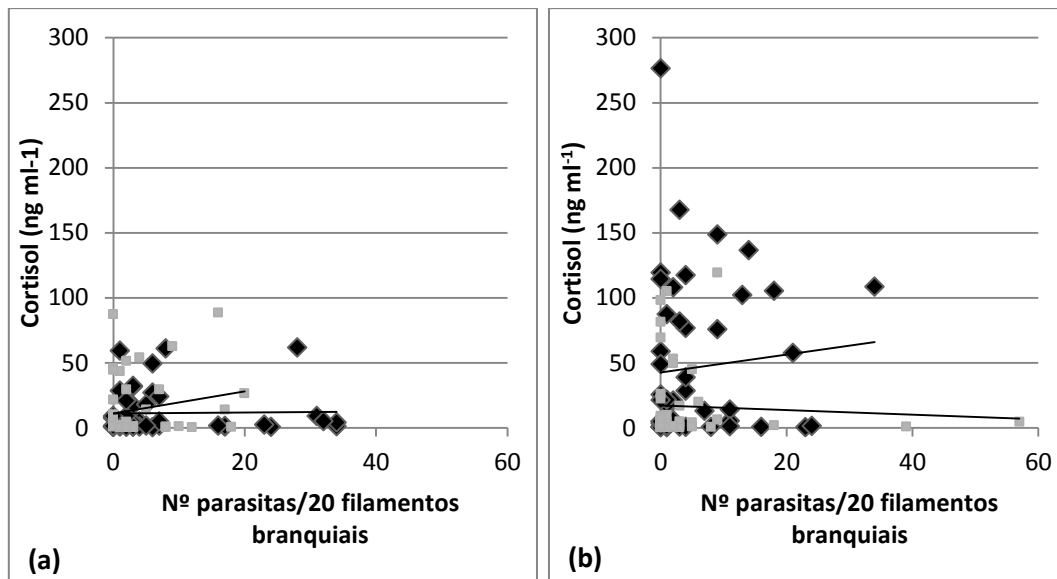


Figura 4.15 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de cortisol ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) no plasma das douradas infectadas e não infectadas na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) ( $n=47-48$ ).

Infectados ( $\blacklozenge$ ):  $y = 0,846x + 11,103$   $R^2 = 0,0365$ ; Teste de correlação de Pearson  $r=0,0803$ ,  $p=0,592$  (1ª amostragem).  $y = 0,6911x + 42,553$   $R^2 = 0,0082$ ; Teste de correlação de Pearson  $r= 0,0904$ ;  $p=0,541$  (2ª amostragem).

Não infectados ( $\blacksquare$ ):  $y = 0,0364x + 11,088$   $R^2 = 0,0005$ ; Teste de correlação de Pearson  $r=0,191$ ;  $p=0,194$  (1ª amostragem).  $y = - 0,1795x + 17,326$   $R^2 = 0,0036$ ; Teste de correlação de Pearson  $r=-0,0599$ ;  $p=0,686$  (2ª amostragem).

Os níveis de glucose ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) (figura 4.16 a e b) no plasma das douradas tem valores muito próximos dos  $4 \text{ mmol l}^{-1}$ , não existindo diferença estatisticamente significativa.

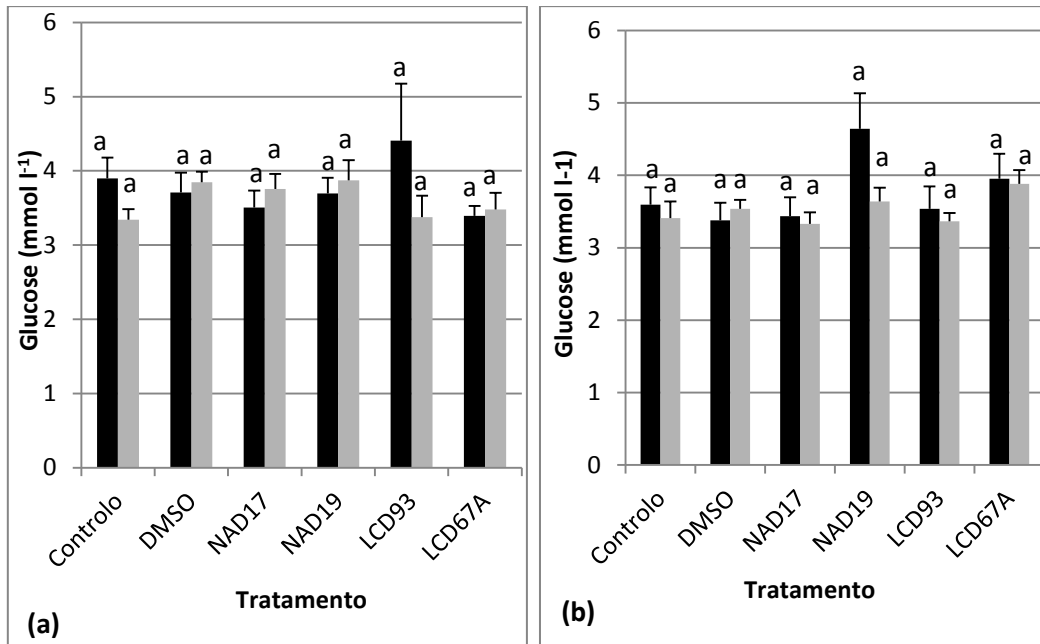


Figura 4.16 – Níveis de glucose ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (■) com *A. ocellatum* expostas a diferentes tratamentos na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias  $\pm$  erro-padrão ( $n = 8$ ).

Letras diferentes - Indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos em peixes infectados e não infectados (ANOVA de um factor);

\*- Indica diferença estatística significativa no mesmo tratamento entre infectados e não infectados (teste t-Student);

# - Indica diferença estatística significativa entre a 1ª e 2ª amostragem no mesmo tratamento e infecção (teste t-Student).

Pela análise da figura 4.17a e b, não existe relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de glucose ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) em plasma de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum*, tanto na 1ª como na 2ª amostragem, comprovado pelo teste de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ).

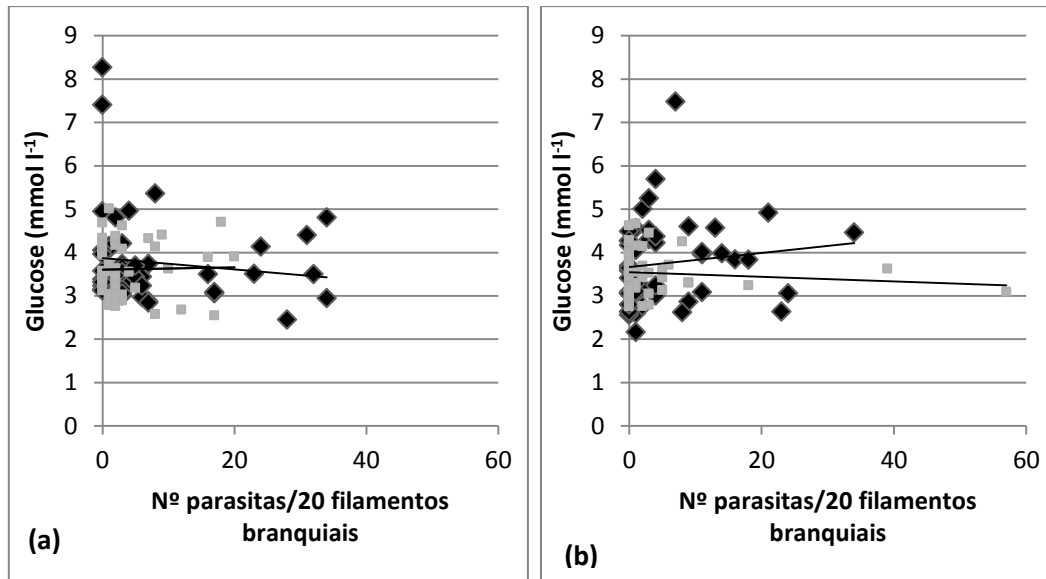


Figura 4.17 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de glucose ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum* na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n=47-48).

Infectados (◆):  $y = -0,013x + 3,8748$   $R^2 = 0,0155$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = -0,137$ ;  $p = 0,359$  (1ª amostragem).  $y = 0,0164x + 3,663$   $R^2 = 0,0172$ ; Teste de correlação  $r = 0,131$ ;  $p = 0,375$  (2ª amostragem).

Não infectados (■):  $y = 0,0027x + 3,6027$   $R^2 = 0,0005$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = 0,0221$ ;  $p = 0,881$  (1ª amostragem).  $y = -0,0053x + 3,547$   $R^2 = 0,00109$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = -0,165$ ;  $p = 0,261$  (2ª amostragem).

Os níveis de proteína ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) medidos foram de cerca de  $20 \text{ ng ml}^{-1}$ , tendo sido ligeiramente superiores na 1ª amostragem (figura 4.18 a).

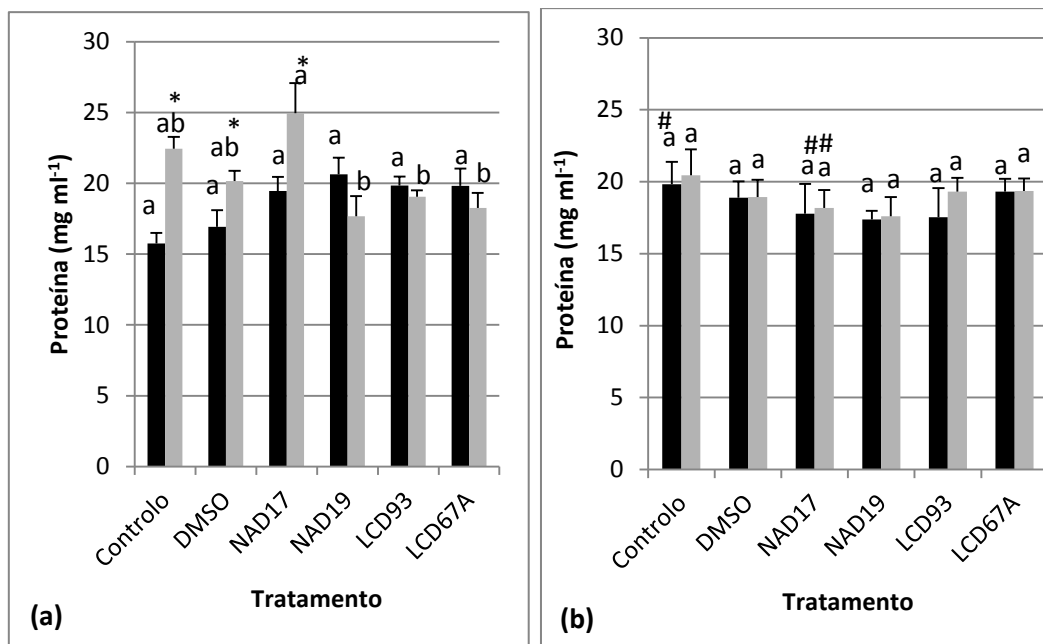


Figura 4.18 – Níveis de proteína ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (■) com *A. ocellatum* expostas a diferentes tratamentos orais na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias  $\pm$  erro-padrão ( $n = 8$ ).

Letras diferentes - Indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos em peixes infectados e não infectados (ANOVA de um factor) ;

\*- Indica diferença estatística significativa no mesmo tratamento entre infectados e não infectados (teste t-Student);

# - Indica diferença estatística significativa entre a 1ª e 2ª amostragem no mesmo tratamento e infecção (teste t-Student).

Pela análise da figura 4.19 a e b, não existe relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de proteína ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) em plasma de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum*, tanto na 1ª como na 2ª amostragem, comprovado pelo teste de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ).

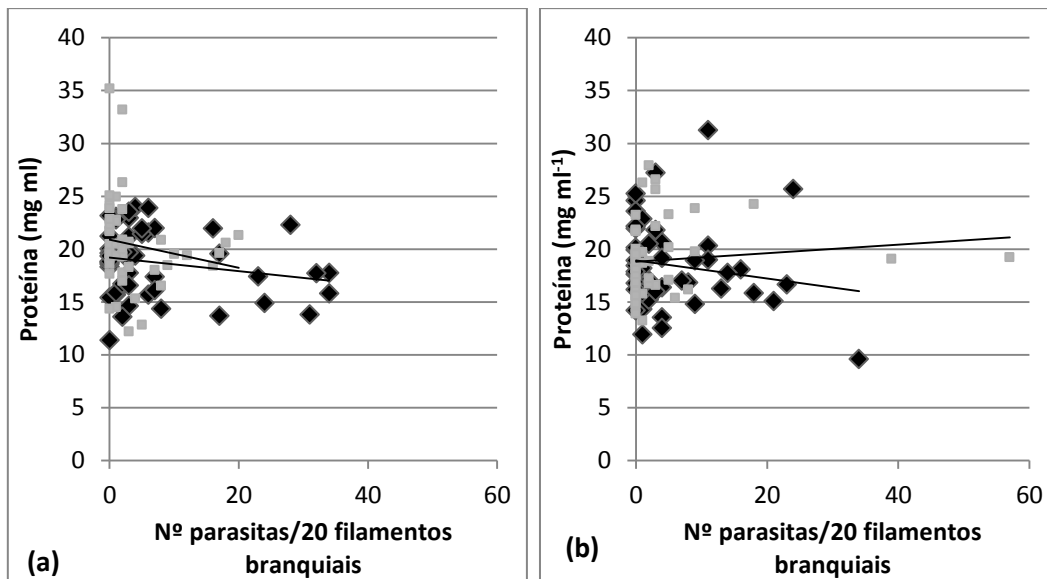


Figura 4.19 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de proteína ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum* na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n=47-48).

Infectados (◆):  $y = -0,0639x + 19,194$   $R^2 = 0,0414$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = -0,223$ ;  $p = 0,133$  (1ª amostragem).  $y = -0,0861x + 18,939$   $R^2 = 0,0271$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = -0,165$ ;  $p = 0,263$  (2ª amostragem).

Não infectados (■):  $y = -0,1345x + 30,912$   $R^2 = 0,00281$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = -0,168$ ;  $p = 0,255$  (1ª amostragem);  $y = 0,0402x + 18,813$   $R^2 = 0,0132$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = 0,115$ ;  $p = 0,437$  (2ª amostragem).

#### 4.3.4. Osmorregulação

Como é possível observar na figura 4.20 b, os níveis de osmolaridade ( $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) diminuíram no plasma sanguíneo de douradas não infectadas tratadas com DMSO e LCD93 da 1ª para a 2ª amostragem.

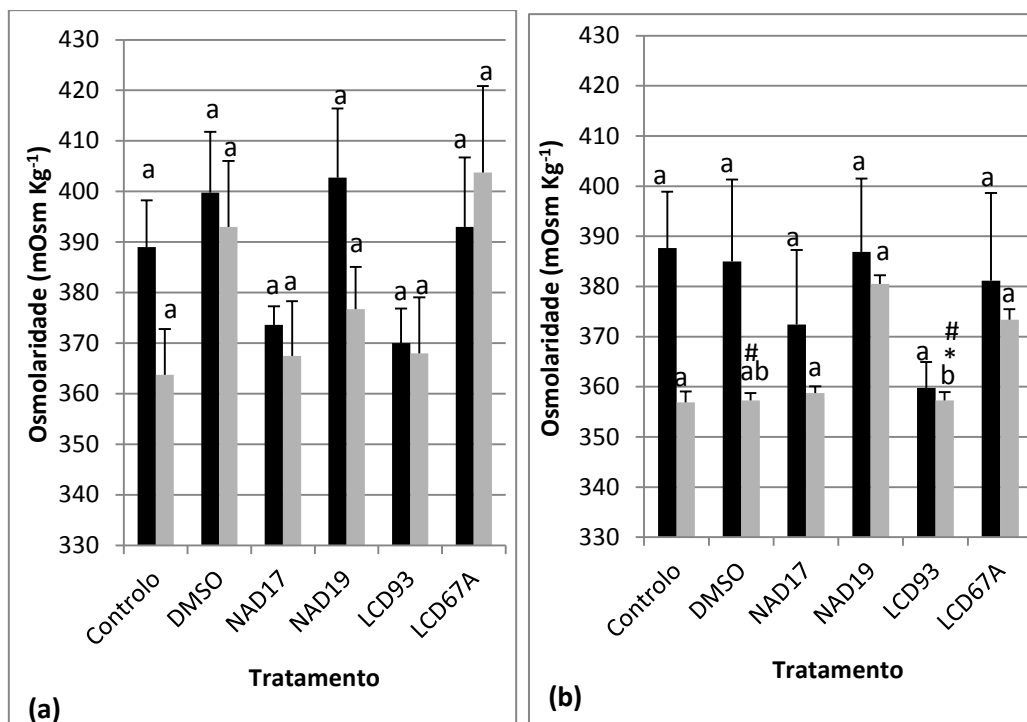


Figura 4.20 – Níveis de osmolaridade (mOsm kg<sup>-1</sup>) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (■) com *A. ocellatum* expostas a diferentes tratamentos orais na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 8).

Letras diferentes - Indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre tratamentos em peixes infectados e não infectados (ANOVA de um factor);

\*- Indica diferença estatística significativa no mesmo tratamento entre infectados e não infectados (teste t-Student);

# - Indica diferença estatística significativa entre a 1ª e 2ª amostragem no mesmo tratamento e infecção (teste t-Student).

Pela análise da figura 4.21 a e b, não existe relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de osmolaridade (mOsm kg<sup>-1</sup>) em plasma sanguíneo de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum*, tanto na 1ª como na 2ª amostragem, comprovado pelo teste de correlação de Pearson (p<0,05).

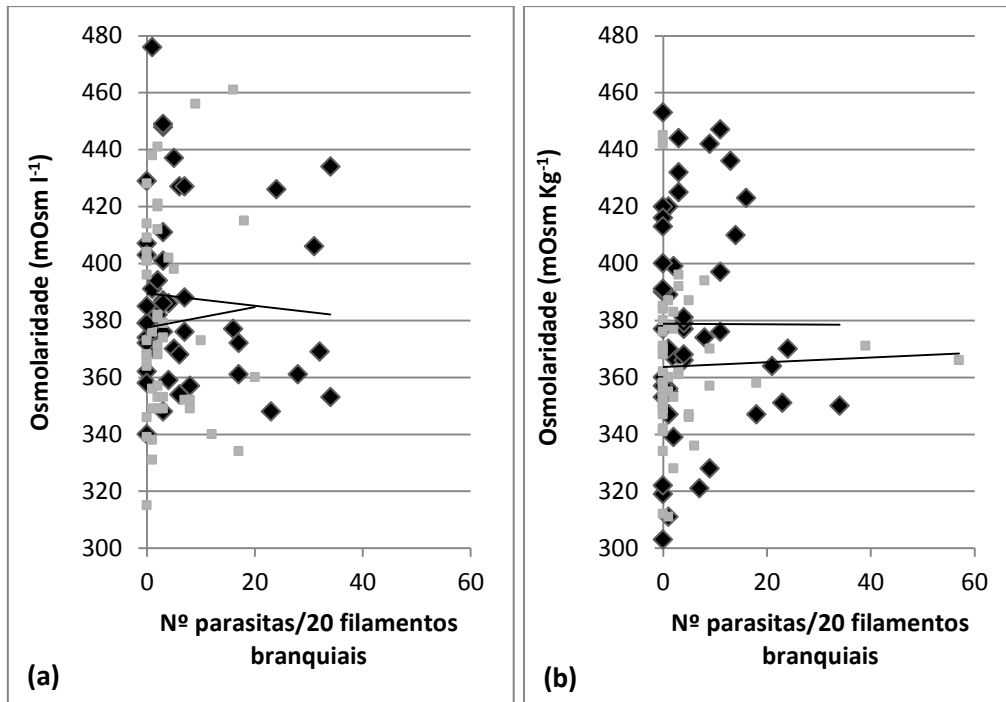


Figura 4.21 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de osmolaridade ( $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum* na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) ( $n=47-48$ ).

Infectados ( $\blacklozenge$ ):  $y = -0,2189x + 389,57$   $R^2 = 0,0054$ ; Teste de correlação de Pearson  $r=-0,0717$ ;  $p=0,632$  (1ª amostragem).  $y = -0,0109x + 378,85$   $R^2 = 5E-06$ ; Teste de correlação de Pearson  $r=-0,00221$ ;  $p=0,988$  (2ª amostragem).

Não infectados ( $\blacksquare$ ):  $y = 0,364x + 377,47$   $R^2 = 0,003$ ; Teste de correlação de Pearson  $r=0,05467$ ;  $p=0,712$  (1ª amostragem).  $y = 0,082x + 363,68$   $R^2 = 0,0011$ ; Teste de correlação de Pearson  $r=0,0324$ ;  $p=0,827$  (2ª amostragem).

As concentrações plasmáticas de cloro apresentaram uma grande variabilidade. No entanto, os níveis de cloro ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) são na maioria dos tratamentos superiores nos peixes infectados (fig. 4.22 a e b) e diminuíram nos peixes tratados com endoperóxidos da 1ª para a 2ª amostragem.

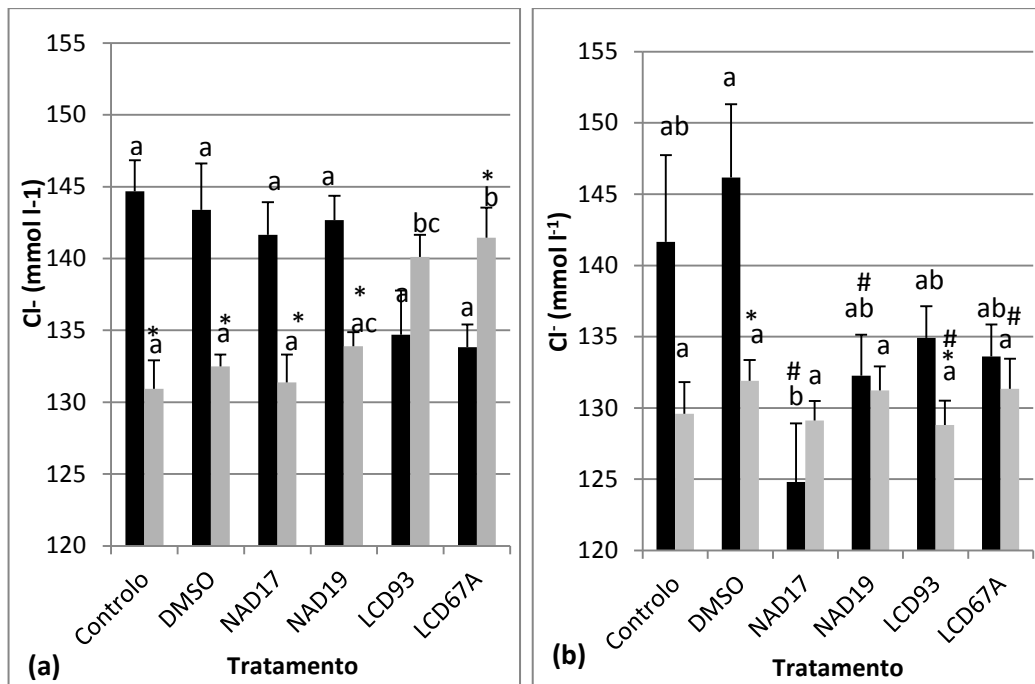


Figura 4.22 – Níveis de cloro ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) em plasma sanguíneo de douradas infectadas (■) e não infectadas (■) com *A. ocellatum* expostas a diferentes tratamentos na 1ª (a) e 2ª amostragem (b). Os valores são as médias  $\pm$  erro-padrão ( $n = 8$ ).

Letras diferentes - Indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos em peixes infectados e não infectados (ANOVA de um factor);

\*- Indica diferença estatística significativa no mesmo tratamento entre infectados e não infectados (teste t-Student);

# - Indica diferença estatística significativa entre a 1ª e 2ª amostragem no mesmo tratamento e infecção (teste t-Student).

Pela análise da figura 4.23 a e b, não existe relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de cloro ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) em plasma de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum*, tanto na 1ª como na 2ª amostragem, comprovado pelo teste de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ).

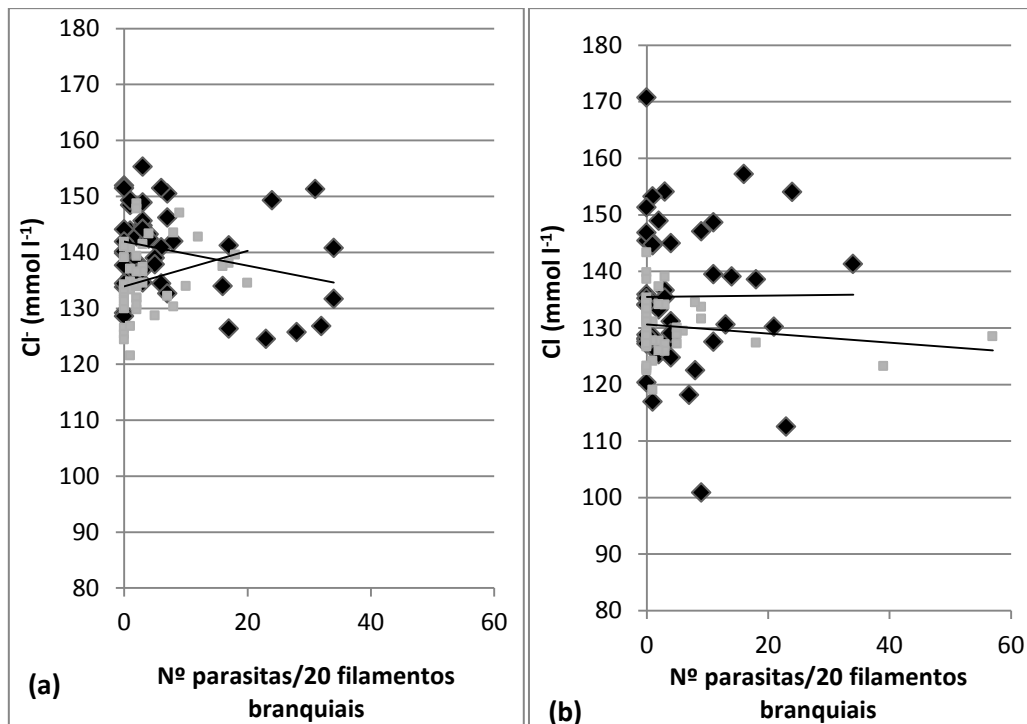


Figura 4.23 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e o nível de cloro ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) em plasma sanguíneo das douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum* na 1ª (a) e 2ª amostragem (b) (n=47-48).

Infectadas (◆):  $y = -0,2138x + 141,91$   $R^2 = 0,0792$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = -0,207$ ;  $p = 0,163$  (1ª amostragem).  $y = 0,0116x + 135,51$   $R^2 = 5E-05$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = 0,00703$ ;  $p = 0,962$  (2ª amostragem).

Não infectadas (■):  $y = 0,3177x + 133,89$   $R^2 = 0,0749$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = 0,274$ ;  $p = 0,0597$  (1ª amostragem).  $y = -0,0809x + 130,65$   $R^2 = 0,00273$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = -0,165$ ;  $p = 0,261$  (2ª amostragem).

Na actividade de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase ( $\mu\text{mol ADP/mg prote\acute{a}na/h$ ) (figura 4.24) não existe diferença estatisticamente significativa entre os peixes do grupo controlo e os que receberam tratamento oral NAD19. No entanto, existe diferença no grupo controlo entre os peixes infectados e os não infectados, tendo os infectados menor actividade nas brânquias.

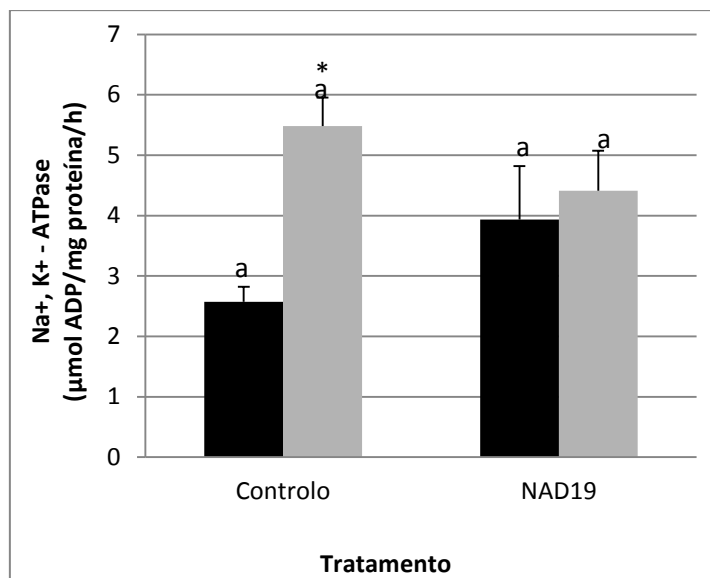


Figura 4.24 – Actividade de Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - ATPase (μmol ADP/mg proteína/h) nas brânquias de douradas infectadas (■) e não infectadas (▒) com *A. ocellatum* de douradas do grupo controlo e do grupo exposto ao tratamento oral com o endoperóxido NAD19 na 2<sup>a</sup> amostragem. Os valores são as médias ± erro-padrão (n = 3).

Letras diferentes - Indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) entre tratamentos em peixes infectados e não infectados;

\*- Indica diferença estatística significativa no mesmo tratamento entre infectados e não infectados;

Pela análise da figura 4.25 a e b, não existe relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e a actividade Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - ATPase (μmol ADP/mg proteína/h) nas brânquias de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum*, comprovado pelo teste de correlação de Pearson (p<0,05).

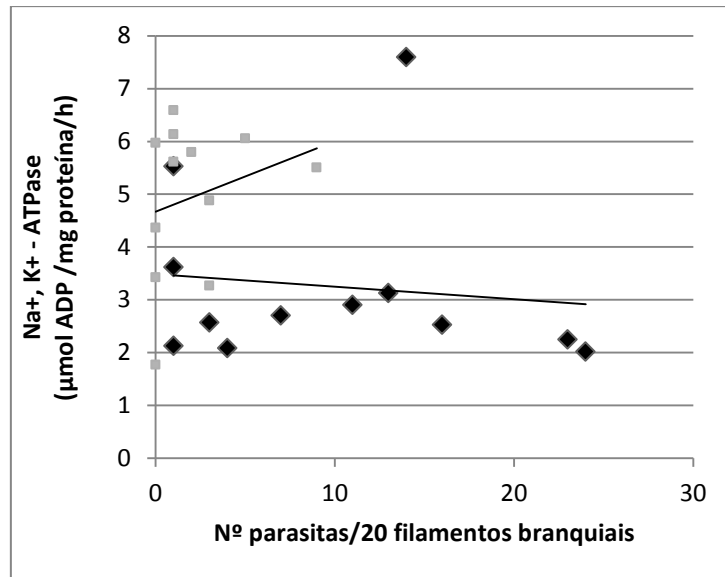


Figura 4.25 – Relação entre o número de parasitas em 20 filamentos branquiais e a actividade Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> - ATPase (μmol ADP/mg proteína/h) nas brânquias de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum* na 2<sup>a</sup> amostragem (n=12).

Infectadas (◆):  $y = -0,0239x + 3,4880$   $R^2 = 0,0141$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = -0,119$ ;  $p = 0,713$ .

Não infectadas (■):  $y = -0,1331x + 4,6693$   $R^2 = 0,0597$ ; Teste de correlação de Pearson  $r = 0,244$ ;  $p = 0,444$ .

#### 4.3.5. Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo

Na 1<sup>a</sup> amostragem existe relação positiva entre a osmolaridade (mOsm kg<sup>-1</sup>) e o cloro (mmol l<sup>-1</sup>) do plasma sanguíneo de douradas infectadas (tabela 4.2), enquanto no plasma sanguíneo das douradas não infectadas (tabela 4.3) a osmolaridade (mOsm kg<sup>-1</sup>) tem relação positiva com o cloro (mmol l<sup>-1</sup>), a glucose (mmol l<sup>-1</sup>) e o cortisol (ng ml<sup>-1</sup>).

Tabela 4.2 – Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo de douradas infectadas na 1<sup>a</sup> amostragem. Teste de correlação de Pearson (n=47). Existe relação quando  $p < 0,05$ .

	Osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> )	Cloro (mmol l <sup>-1</sup> )	Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	Proteína (mmol l <sup>-1</sup> )	Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )
Osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> )	-	$r = 0,455$ $p = 0,00133$	$r = 0,132$ $p = 0,378$	$r = 0,146$ $p = 0,326$	$r = 0,0803$ $p = 0,922$
Cloro (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	$r = 0,186$ $p = 0,210$	$r = 0,0293$ $p = 0,845$	$r = -0,0097$ $p = 0,949$
Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	-	$r = 0,0396$ $p = 0,791$	$r = -0,0176$ $p = 0,906$
Proteína (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	$r = 0,164$ $p = 0,270$
Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-

Tabela 4.3 - Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo de douradas não infectadas na 1ª amostragem. Teste de correlação de Pearson (n=48). Existe relação quando  $p < 0,05$ .

	Osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> )	Cloro (mmol l <sup>-1</sup> )	Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	Proteína (mmol l <sup>-1</sup> )	Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )
Osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> )	-	r=0,429 p=0,00237	r=0,297 p=0,0406	r=-0,0693 p=0,640	r=0,492 p=0,000388
Cloro (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	r=-0,0988 p=0,504	r=-0,274 p=0,0598	r=0,164 p=0,265
Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	-	r=-0,0372 p=0,802	r=0,226 p=0,122
Proteína (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	r=-0,128 p=0,388
Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-

Na 2ª amostragem (tabela 4.4) a osmolaridade (mOsm kg<sup>-1</sup>) do plasma sanguíneo de douradas infectadas tem relação positiva com o cloro (mmol l<sup>-1</sup>), a glucose (mmol l<sup>-1</sup>) e a proteína (mmol l<sup>-1</sup>), e o cloro (mmol l<sup>-1</sup>) tem relação positiva com a proteína (mmol l<sup>-1</sup>). Enquanto nas douradas não infectadas a osmolaridade (mOsm kg<sup>-1</sup>) apenas tem relação positiva com o cloro (mmol l<sup>-1</sup>) e a glucose (mmol l<sup>-1</sup>) (tabela 4.5).

Tabela 4.4 - Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo de douradas infectadas na 2ª amostragem. Teste de correlação de Pearson (n=48). Existe relação quando  $p < 0,05$ .

	Osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> )	Cloro (mmol l <sup>-1</sup> )	Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	Proteína (mmol l <sup>-1</sup> )	Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )
Osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> )	-	r=0,424 p=0,00270	r=0,317 p=0,0280	r=0,333 p=0,0207	r=0,0219 p=0,883
Cloro (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	r=0,0994 p=0,501	r=0,250 p=0,0870	r=-0,0694 p=0,639
Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	-	r=0,0129 p=0,931	r=0,213 p=0,146
Proteína (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	r=-0,0747 p=0,614
Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-

Tabela 4.5 - Relações entre as análises bioquímicas ao plasma sanguíneo de douradas não infectadas na 2ª amostragem. Teste de correlação de Pearson (n=48). Existe relação quando  $p < 0,05$ .

	Osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> )	Cloro (mmol l <sup>-1</sup> )	Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	Proteína (mmol l <sup>-1</sup> )	Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )
Osmolaridade (mOsm kg <sup>-1</sup> )	-	r=0,389 p=0,00627	r=0,306 p=0,0345	r=0,00217 p=0,988	r=-0,0869 p=0,557
Cloro (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	r=-0,00445 p=0,976	r=-0,185 p=0,207	r=0,0757 p=0,609
Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	-	r=-0,216 p=0,141	r=-0,0240 p=0,872
Proteína (mmol l <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	r=0,108 p=0,465
Cortisol (ng ml <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-

## 5. Discussão

*A. ocellatum* é um agente patogénico que afecta vários peixes marinhos e euralianos, especialmente espécies marinhas comerciais (Oestmann e Lewis, 1996), como a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) nas aquaculturas semi-intensivas de Portugal. Os surtos iniciam-se, normalmente, na Primavera quando a temperatura da água aumenta e são especialmente epizooticos no Verão, coincidindo com o período de elevada procura comercial. Com base na necessidade de desenvolver estratégias para a profilaxia e controlo de *A. ocellatum*, realizaram-se ensaios *in vitro* e *in vivo* com novos fármacos, uma vez que os correntes métodos não são efectivos a eliminar todas as formas do parasita e requerem longos períodos de exposição. Neste caso, foram usados os endoperóxidos, que demonstraram a sua eficácia em outros protozoários, como o *Plasmodium falciparum* (Opsenica e Šolaja, 2009; O'Neill *et al.*, 2010, Delves *et al.*, 2012) e o *Perkinsus sp.* (Cristiano, 2010).

Para a realização de ensaios *in vitro*, foi necessário isolar o parasita de peixes infectados, uma vez que, não se conhece nenhum método que possibilite o isolamento do parasita através da água ou do solo. A descoberta de um método capaz de obter o parasita do solo ou da água evitaria o recurso a animais saudáveis, o que estaria de acordo com o princípio dos 3R's (Replacement, Reduction e Refinement). Além disso, seria ainda um contributo para o estudo da biologia do parasita, do qual apenas se sabe até à data que o parasita completa o seu ciclo de vida, quando a célula-mãe foi isolada de um peixe.

O método adaptado de Bower *et al.* (1987) não demonstrou ser o mais eficaz neste estudo pois suspeita-se da perda de tomites através da sinfonagem, que para além de ser um método muito moroso, não pode ser aplicado a espécies menos tolerantes a meios hipossalinos. O outro método adoptado de Roberts-Thomson *et al.* (2006), apesar de também ser stressante para o peixe, é realizado num menor espaço de tempo. De modo a estudar o *A. ocellatum*, uma técnica de propagação do parasita *in vitro* é necessária para que seja possível ter parasitas sempre que se pretenda iniciar um ensaio e em quantidades suficientes que permitam obter resultados fiáveis. Por exemplo, Ullal (2006) para testar o efeito de HbβP-1 em *A. ocellatum* utilizou parasitas isolados de *Morone saxatilis* propagados numa linha de células das brânquias. Vários outros autores desenvolveram e melhoraram meios de cultura capazes de produzir o parasita (Bower *et al.*, 1987; Noga, 1987; Oestmann e Lewis, 1995; Oestmann e Lewis, 1996).

Em relação aos métodos utilizados para contar o parasita, alguns autores optaram por uma “sedgwick-rafter counting cell” para contar o número total de dinosporos imobilizados com formol (Bower *et al.*, 1987, Masson *et al.*, 2011), enquanto outros optaram pela utilização de uma técnica específica de PCR (Levy *et al.*, 2007).

Os parasitas observados no isolamento mantiveram a sua forma e realizaram a encapsulação em contacto com água doce e mesmo tendo-se observado contracção do citoplasma dos tomontes, isto não pareceu afectar a sua divisão e consequente esporulação, tal como observaram Bower *et al.* (1987).

Durante os ensaios *in vitro* observaram-se tomontes em diferentes estados de divisão, devido ao facto de não existir sincronia de divisões entre tomontes, resultando numa variabilidade no tempo de esporulação entre estes (Paperna, 1984b). O intervalo de temperatura de 23-27°C deveria ter sido o ideal para ocorrer um “sucesso de divisão” de 100% ao fim de 2-3 dias (Paperna, 1984b), porém nos primeiros ensaios *in vitro* tal não aconteceu. Existem várias razões para não se terem observado dinosporos, tais como, os trofontes não terem o tamanho ideal a quando do desprendimento das brânquias (Paperna, 1984b), a sua rápida mobilidade o que torna difícil a sua pipetagem e observação ao microscópio, neste caso, à quantidade de água pipetada deveria ter-se adicionado anestésico para imobilizar os dinosporos. Para além da dessincronização entre tomontes, observou-se ainda dessincronização na divisão dos tomitos dentro do mesmo tomonte, contrariamente ao observado por Paperna (1984b).

Após incubação 1 dia a 4°C os tomontes demonstraram uma diminuição na capacidade de divisão. Segundo (Paperna, 1984b), a divisão após incubação a 8°C vai sendo adiada progressivamente à medida que o período de incubação é prolongado. No entanto, no estudo de criopreservação do *A. ocellatum* desenvolvido por Yang (2005), apenas após 48 horas de armazenamento a 4°C é que existe uma divisão irregular e mais lenta do parasita.

Nos ensaios *in vitro* de exposição do parasita aos endoperóxidos observaram-se tomontes em estado mais avançado de divisão nos poços de controlo que nos restantes poços. No entanto, o mesmo não aconteceu nos poços que continham apenas solvente, nestes observou-se um efeito inibitório na divisão do parasita por vezes superior ao observado nos poços que continham endoperóxido. Segundo Yang (2005) é possível conservar o parasita a uma concentração de 3-10% de DMSO. Em próximos ensaios seria interessante testar o efeito de outros solventes na divisão do parasita, como por exemplo o etanol.

Nos ensaios *in vitro* com NAD17 e NAD19 a 2mM observaram-se tomontes em estados de divisão mais avançados que nos ensaios com os mesmos fármacos a menores

concentrações. Estes fármacos quando testados a 1mM, foi possível observar tomontes no primeiro estado de divisão ( $2t/T$ ) às 24 horas, porém às 48 horas apenas se observaram tomontes que não tinham entrado em divisão. Uma vez que o tomonte ao dividir-se torna-se mais pequeno, possivelmente a teca (parede externa da célula) fica mais sensível e mais vulnerável à actuação dos endoperóxidos. Além disso nos vários ensaios *in vitro*, para além da dessincronização na divisão entre tomontes também observada por Paperna (1984b), observou-se uma dessincronização na divisão dos tomitos dentro do mesmo tomonte. Alguma desta variabilidade pode ser atribuída a defeitos que ocorram nas tecas de células em divisão ou resultado de uma incompleta vedação da parede celular durante a transformação de trofonte em tomonte (Paperna, 1984b). No ensaio com LCD93, no qual o volume de DMSO foi superior (40  $\mu$ l) na concentração mais elevada (1mM), observou-se inibição do desenvolvimento do parasita. Apesar de não ter sido possível comparar directamente o efeito do endoperóxido LCD67A a 0,1mM com os restantes endoperóxidos uma vez que não se realizou nenhum ensaio com este endoperóxido a esta concentração, observou-se tal como no LCD93 estados menos avançados de divisão, porém este foi o fármaco no qual se observou estados mais avançados de divisão. Apesar do solvente parecer ter um efeito inibitório, este efeito parece ser mais notório em conjunto com um endoperóxido. As concentrações testadas encontram-se dentro do intervalo de concentrações de antiprotozoários testados em *Perkinsus olseni* (Elandalloussi *et al.*, 2005).

O índice de desenvolvimento do parasita para além de comprovar as observações dos gráficos de abundância relativa do parasita, teria como objectivo calcular o LC<sub>50</sub>, no entanto não foi possível calcular o LC<sub>50</sub> pois testaram-se apenas três concentrações devido à dificuldade em obter parasitas para a realização de mais ensaios a diferentes concentrações.

No ensaio *in vivo*, para a infecção dos peixes do grupo “não infectados” utilizou-se uma quantidade conhecida (Bower *et al.*, 1987; Roberts-Thomson *et al.*, 2006) de parasita ( $\pm 667$  dinosporos por aquário) em vez de colocar um peixe infectado em cada aquário (Masson, 2009).

Após a distribuição dos dinosporos pelos aquários os peixes infectados deveriam demonstrar sinais clínicos (anorexia, respiração rápida e superficial, natação errática) associados à amiloodiniose após 5-8 dias (Bower *et al.*, 1987), porém só as douradas do aquário 10 que revelaram uma ligeira anorexia.

Durante o ensaio *in vivo* ocorreu contaminação das douradas do grupo “não infectados”, esta contaminação pode ter ocorrido devido aos pequenos salpicos durante a renovação da água com a mesma mangueira, além disso os aquários deviam estar noutro

compartimento para evitar a contaminação. Segundo Roberts-Thomson *et al.* (2006), o *A. ocellatum* pode ser transportado em gotas de aerossol entre tanques muito próximos, outros autores defendem ainda que o parasita pode ser transmitido através de fômites, como equipamentos e mãos dos utilizados (Francis-Floyd e Floyd, 2011).

Para a análise parasitológica, realizou-se a contagem de trofontes em 20 filamentos branquiais, porém num outro estudo realizado com o parasita o autor optou pela fixação de brânquias em formalina a 5% e após 24 horas descartar o sobrenadante e acrescentar álcool a 70%, homogeneizado de seguida a mistura retirando 3 alíquotas para observação em câmara de Mac Máster (Santos, 2011). Durante a contagem dos trofontes, observaram-se trofontes de cor clara e pequenas dimensões. Dado que tanto na primeira amostragem como na segunda observaram-se trofontes com estas características, a hipótese de não ter ocorrido nenhum surto capaz de provocar a morte do peixe é apresentada. Esta hipótese tem como base o trabalho de Paperna (1984b), segundo o qual o desalojamento dos trofontes inicia-se ao 3º dia de infecção e está completo ao 6º dia a 9-24°C. De modo a perceber o nível de infecção em futuras experiências dever-se-á medir os trofontes e comparar com outros trabalhos (Paperna, 1984b; Severino, 2008).

Uma vez que no ensaio *in vivo* nenhum dos fármacos teve uma eficácia de 100%, tal pode dever-se à dose testada ter sido baixa. Para que um fármaco seja eficaz, este tem de ser absorvido e distribuído pelo hospedeiro, atingindo os tecidos alvo onde o parasita se encontra na forma activa em doses suficientes (Williams, 2009). E actualmente nada se sabe sobre a biodisponibilidade e a farmacocinética dos endoperóxidos em peixes. Para se investigar a eficácia de um composto contra um parasita, é necessário planeamento, ensaios, amostragem, parasitas em quantidade suficiente e análise estatística dos dados.

Para além da dose testada, o método escolhido para administrar os fármacos aos peixes pode não ter sido o mais apropriado para o tipo de fármacos em estudo. A principal limitação na medicação através do alimento é que o peixe tem realmente de se alimentar e uma vez que os peixes doentes, principalmente com amilodinirose, têm tendência a deixar de se alimentar, os tratamentos orais são mais um método profiláctico do que um método terapêutico (Daniel, 2009). Apesar do método mais utilizado de tratamento oral em peixes ser através da alimentação, existem outros sistemas de disponibilidade oral, como a bioencapsulação e as microesferas (Daniel, 2009). Os tratamentos orais requerem menos trabalho que os tratamentos através de banhos, uma vez que o peixe pode ser tratado como parte do seu normal regime de alimentação e têm menos impacto em outros organismos (Grant, 2002).

Para além dos banhos e dos tratamentos orais, a administração de medicação em peixes pode ser feita através de injeção. Apesar de a injeção ser a opção mais efectiva, existem contudo várias limitações para este método. Para além da manipulação, da anestesia e da injeção serem stressantes para o peixe, exige também um trabalho intensivo, é mais custosa e não é praticável em grandes quantidades de peixes com menos de 20g (Plant e LaPrata, 2011).

O grupo endoperóxido é o farmacóforo que confere aos endoperóxidos a sua capacidade antimalárica, dependendo esta acção farmacológica da bioactivação pelo ferro existente no vacúolo alimentar do parasita da malária (Opsenica e Šolaja, 2009), deste modo é necessário estudar a biologia do *A. ocellatum*.

A palavra stress é um termo largamente utilizado quer em linguagem corrente, quer em linguagem científica. No entanto, este termo gera grande confusão, pelo que necessita de ser definido com clareza. Um peixe de uma dada espécie colocado num meio onde as características físico-químicas e biológicas são óptimas, não desenvolve qualquer reacção de adaptação, independentemente do tempo de exposição a esse meio. Se, no entanto, se produzirem alterações das características do meio que ultrapassem o intervalo de intensidade e/ou tempo ultrapassando as capacidades de adaptação do organismo, fala-se então de stress (Henrique, 2000). Apesar do conceito de stress ser largamente aceite pelos biólogos, a definição de stress varia (Chrousos e Gold, 1992). Nesta tese, o stress é definido como uma condição na qual a homeostase está ameaçada ou alterada devido à exposição de peixes à amilodinirose. O stress em si mesmo não pode ser medido, podendo-se apenas determinar quantitativamente indicadores da resposta fisiológica ao stress provocado pela amilodinirose. Neste estudo mediram-se os níveis de cortisol como indicador da resposta primária ao stress e de glucose, proteína, cloro e osmolaridade no plasma sanguíneo de douradas como indicadores de respostas secundárias ao stress.

Os resultados das análises realizadas com o plasma sanguíneo dos peixes amostrados foram comparados com os resultados obtidos num estudo sobre resposta osmorregulatória branquial à salinidade em douradas (Laiz-Carrión *et al.*, 2005), no qual as douradas encontravam-se em condições semelhantes às do estudo.

Os níveis de cortisol e glucose plasmáticos para além de serem geralmente usados como indicadores de uma resposta primária e secundária ao stress, respectivamente, são também usados como indicadores para determinar a duração e severidade do stress (Henrique *et al.*, 1996). No ensaio *in vivo* a maioria dos níveis de cortisol medidos foram elevados, acima de  $3,3 \pm 0,33 \text{ ng ml}^{-1}$ . As douradas infectadas tratadas com LCD67A (na 1ª amostragem)

e as douradas infectadas tratadas com NAD17 e NAD19 (na 2ª amostragem) tiveram níveis de cortisol normais ( $\pm 3,3 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Quanto ao grupo controlo, tanto na 1ª como na 2ª amostragem, os níveis de cortisol foram inferiores aos níveis de cortisol do ensaio preliminar em peixes infectados. Existem no entanto alguns estudos com parasitas - em truta arco-íris infectada com o parasita sanguíneo *Cryptobia salmositica* (Laidley *et al.*, 1988) e com *Ichthyophonus hoferi* (Rand e Cone, 1990) - nos quais não foram encontrados aumentos do cortisol plasmático, sugerindo que a parasitologia não activa o eixo hipotálamo.

O facto de não se ter utilizado anestésico deve-se a que alguns autores referirem que estes podem fornecer falsos negativos relativamente à presença de *A. ocellatum* (Francis-Floyd e Floyd, 2011), o que poderá ter tido efeito nos valores elevados de cortisol plasmático. No entanto os resultados no que referem à utilização de anestésicos para bloquear ou diminuir o stress não são concordantes. O anestésico MS-222 (tricaina), que é utilizado com frequência em aquacultura, evidenciou ter quer um supressor quer um efeito indutor de stress em douradas, dependendo da dose utilizada (Molinero e Gonzales, 1995). No entanto devido à discrepância e aos elevados valores (por exemplo  $120 \text{ ng ml}^{-1}$ ) obtidos de cortisol nalgumas amostras é possível que tenha ocorrido algum erro durante as medições de cortisol por parte do manipulador.

Os níveis de glucose medidos no plasma sanguíneo de douradas sujeitas a diferentes tratamentos, tanto na 1ª como na 2ª amostragem foram próximos do valor considerado padrão ( $3,66 \pm 0,24 \text{ mmol l}^{-1}$ ). Quanto aos níveis de proteína ( $\text{mg ml}^{-1}$ ) medidos, estes foram mais baixos ( $\pm 20 \text{ mg ml}^{-1}$ ) que os medidos no ensaio de condições semelhantes ( $37,5 \pm 4,3 \text{ mg ml}^{-1}$ ) (Laíz-Carrión *et al.*, 2005). Tal como noutro estudo (Rotllant *et al.*, 1997) não se observou um aumento da glicemia, apesar dos níveis de cortisol plasmático serem elevados. No entanto, a ausência de hiperglicemia não pode ser considerada como a ausência de stress, pois deve-se ter em conta outros factores que interferem directamente com a glicemia, como é o caso da composição do alimento (Hemre *et al.*, 1991) e as características genéticas da população em estudo (Fevolden e Røed, 1993).

Os valores de osmolaridade ( $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) foram elevados ( $> 312 \pm 3,2 \text{ mOsm kg}^{-1}$ ), as douradas tratadas com LCD93 foram as que tiveram valores mais baixos de osmolaridade assim como as douradas da 2ª amostragem não infectadas dos grupos controlo, DMSO e NAD17. Já os níveis de cloro medidos no ensaio *in vivo* foram menores ( $< 152 \pm 3 \text{ mmol l}^{-1}$ ) que os medidos no ensaio semelhante. Este desequilíbrio nos valores de osmolaridade e de cloro podem ser devido ao stress que os peixes estavam sujeitos devido à infecção com *A. ocellatum*.

Segundo Noga e Levy (2006), a redução da osmorregulação e as infecções microbianas secundárias devido às lesões severas no epitélio podem também ser importantes causas de debilitação e morte. Uma vez que a actividade de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase medida nas brânquias, que é o principal órgão na osmorregulação (Laíz-Carrion *et al.*, 2005), de douradas infectadas e não infectadas com *A. ocellatum* foi baixa ( $<15 \mu\text{mol ADP/mg prote\acute{a}na/h$ ) e visto não ter ocorrido mortalidade durante o ensaio, talvez a redução da osmorregulação não seja uma das causas de morte. Além disso, uma vez que os valores de cortisol foram altos, era de esperar um aumento da actividade branquial de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase, pois nos peixes teleósteos euralianos o cortisol actua em órgãos de osmorregulação aumentando em algumas espécies a sua actividade branquial de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase (Mancera *et al.*, 1994). No entanto, será necessário realizar mais medições pois apenas se mediu a actividade de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase ( $\mu\text{mol ADP/mg prote\acute{a}na/h$ ) em 6 peixes de cada grupo.

De acordo com os dados recolhidos não existe uma relação entre a quantidade de trofontes em 20 filamentos branquiais e as respostas fisiológicas ao stress analisadas (cortisol, cloro, glucose, prote\acute{a}na, osmolaridade e actividade de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  - ATPase). No entanto existe uma relação positiva entre a osmolaridade ( $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) e o cloro ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) no plasma sanguíneo de douradas infectadas e não infectadas, tanto na 1ª como na 2ª amostragem, pois o aumento dos níveis de  $\text{Cl}^-$  induz o aumento da osmolaridade do plasma (Lichtstein *et al.*, 1992; Widmaier *et al.*, 2008). Existe ainda uma relação positiva entre a osmolaridade e a glucose ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) no plasma de douradas não infectadas na 1ª amostragem e de douradas infectadas e não infectadas na 2ª amostragem. A glucose é um dos componentes do plasma (Weisberg, 1989), alterações nos seus níveis poderão alterar os níveis de osmolaridade. O teste de Pearson revelou também a existência de uma relação positiva entre a osmolaridade ( $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) e o cortisol ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) nas douradas não infectadas da 1ª amostragem, entre a osmolaridade ( $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) e a prote\acute{a}na ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) e o cloro ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) e a prote\acute{a}na ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) no plasma de douradas infectadas na 2ª amostragem. É possível que na realidade não exista uma verdadeira relação entre certos indicadores, mas sim que ambos tenham aumentado devido aos animais estarem sujeitos a uma situação de stress.

As medições realizadas ao plasma sanguíneo e às brânquias de douradas com diferentes níveis de infecção de *A. ocellatum* revelam que não existe diferença significativa entre os controlos e os endoperóxidos para a dose testada.

## 6. Conclusão

Durante o presente trabalho avaliou-se o efeito dos endoperóxidos na divisão do parasita e em douradas quando administrados oralmente.

Nos ensaios *in vitro* o NAD19 a 0,1mM e o LCD93 a 1mM inibiram a divisão do parasita tanto na observação realizada às 24 horas como após 48 horas. Para além do volume de solvente (DMSO) utilizado no ensaio ter sido elevado, o solvente parece ter um efeito inibitório na divisão do parasita.

Uma vez que no ensaio *in vivo* ocorreu contaminação dos peixes do grupo “não infectados” não foi possível comparar o efeito dos fármacos entre peixes infectados e não infectados. Nas análises efectuadas ao plasma sanguíneo, com excepção das medições de cortisol e cloro, não existe diferença estatisticamente significativa nos valores medidos tanto entre infectados e não infectados como da primeira para a segunda amostragem.

Será necessário realizar mais ensaios para obter conclusões sobre o efeito dos endoperóxidos no controlo do parasita de peixes *A. ocellatum*.

## 7. Considerações finais

O presente estudo assume importância a nível mundial, uma vez que o *A. ocellatum* é um ectoparasita de distribuição mundial para o qual não existe nenhuma metodologia que permita a sua erradicação dos sistemas piscícolas.

Com base na informação recolhida é importante realizar mais ensaios sobre o ciclo de vida do *A. ocellatum*, principalmente para averiguar se o parasita tem ferro, o qual é essencial para a actuação deste tipo de fármacos. Caso se comprove a sua existência será necessário realizar ensaios *in vitro* em que se testem os fármacos utilizando a mesma quantidade de solvente em pequenas quantidades e comprovar que o solvente não afecta a divisão do parasita. Para a realização dos ensaios *in vitro* é aconselhado o desenvolvimento de um meio de cultura ou o desenvolvimento de um método capaz de obter o parasita da água ou solo contaminados.

Os ensaios *in vivo* só deverão ser realizados após se comprovar a eficácia dos endoperóxidos *in vitro*. Durante os ensaios *in vivo* é sugerido que os peixes infectados estejam num compartimento diferente dos peixes não infectados para evitar contaminação cruzada e para se poder avaliar o efeito dos fármacos tanto na sua eficácia como no seu modo de actuação na fisiologia dos animais.

## Referências bibliográficas

- Abreu, P. C., Robaldo, R. B., Sampaio, L. A., Bianchini, A., Odebrecht, C. (2005) Recurrent amyloodiniosis on broodstock of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*: Dinospore monitoring and prophylactic measures. *Journal of the World Aquaculture Society*. 36 (1).
- Arthur, J.R., Lumanlan-Mayo, S. (1997) Checklist of the parasites of fishes of the Philippines. *FAO Fisheries Technical Paper*. 369: 102.
- Basurco, B. e Toranzo, A.E. (2004) General aspects of Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories. In: *Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories; Results of the survey on Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories conducted within the framework of the CIHEAM/FAO network on "Technology of Aquaculture in the Mediterranean" (TECAM); Options Mediterraneennes. Serie B: Etudes et Recherches (France)*, Alvarez-Pellitero, P. (ed.) Barja, J.L. (ed.) Basurco, B. (ed.) Berthe, F. (ed.) Toranzo, A.E. (ed.) / *Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneennes, Zaragoza (Spain)*. *Inst. Agronomique Mediterranee*. 49:19-27.
- Bodinier, C., Sucré, E., Lecurieux-Belfond, L., Blondeau-Bidet, E., Charmantier, G. (2010) Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 155: 220-228.
- Bower, C. E., Turner, D. T., Biever, R. C. (1987) A standardized method of propagating the marine fish parasite, *Amyloodinium ocellatum*. *Journal of Parasitology*. 73 (1):85-88.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.
- Brunton, L.L., Lazo, J. S., Parker, K.L. (2006) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Medical. 11 (39).
- Bush, A. O, Lafferty, K. D.; Lotz, J. M., Shostak, A. W. (1997) Parasitology meets ecology on its own terms. *Margolis et al Revisited*. *Journal of Parasitology*. 83 (4): 575-578.
- Cachon, J. e Cachon, M. (1987) Parasitic dinoflagellates. In: Taylor, F.J.R. (ed.) *The Biology of Dinoflagellates*. Blackwell, Oxford, UK. 71–610.
- Canosa, B. (2006) Test of effects caused by chemical action of CuSO<sub>4</sub> (widely used fungicide-algicide). *Tese de mestrado em aquaculture*. Universidade do Algarve. 55.
- Cecchini, S., Saroglia, M., Terova, G., Albanesi, F. (2001) Detection of antibody response against *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) in serum of naturally infected European sea bass by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 21 (3):104-108.

- Chrousos, G.P. e Gold, P.W. (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physiological and behavioural homeostasis. *Journal of the American Medical Association*. 267: 1244-1252.
- Cheung, P. J., Nigrelli, R. F., Ruggieri, G. D. (1981) *Oodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Donoflagellata) in the kidney and other internal tissues of pork fish, *Anisotremus virginicus* (L). *Journal of Fish Diseases*. 4 (6):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):125-133.
- Colomi, A. (1994) Hyperparasitism of *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida, Oodinidae). *Diseases of Aquatic Organisms*. 19 (2).
- Colomi, A., Ullal, A., Heinisch, G., Noga, E. J. (2008) Activity of the antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites. *Journal of Fish Diseases*. 31 (6).
- Conroy, G. e Conroy, D. (2008) Oodiniasis in farmed tilapias. IN: *Aquaculture Health International*. VIP PUBLICATIONS LTD. 12: 20-21.
- Cristiano, M. L. (2010) Applications of antimalarial endoperoxide drugs in aquaculture. 2nd UTEN Workshop 2010, Marine and Bio-Sciences, 27-28 September, Faro, Portugal Comunicação oral. Acedido em Julho 2012, disponível em: <http://utenportugal.org/events/marine-science-workshop/program/>.
- Cruz-Lacierda, E. R., Maeno, Y., Pineda, A. J. T., Matey, V. E. (2004) Mass mortality of hatchery-reared milkfish (*Chanos chanos*) and mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) caused by *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida). *Aquaculture*. 236 (1-4):85-94.
- Daniel, P. (2009) Drugs and chemicals in aquafeeds: The problems and solutions. IN: *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquacultu*. *Options Méditerranéennes*. 86(A): 85-94.
- Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E. A., Sinden, R. E., Leroy, D. (2012) The Activities of Current Antimalarial Drugs on the Life Cycle Stages of Plasmodium: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. *PLoS Med*. 9(2): e1001169.
- Elandalloussi, L. M., Leite, R. B., Rodrigues, P. M., Afonso, R., Nunes P. A., Cancela, M. L. (2005) Effect of antiprotozoal drugs on the proliferation of the bivalve parasite *Perkinsus olseni*. *Aquaculture*. 243: 9– 17.
- Fensome, R.A., Taylor, F.J.R., Norris, G., Sarjeant, W.A.S., Wharton, D.I., Williams, G.L. (1993) A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropaleontological Species Publication*. 7: 351.

- Fevolden, S. E. e Roed, K. H. (1993) Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. *Journal of Fish Biology*. 43: 919-930.
- Francis-Floyd, R. e Floyd, M. R. (2011) *Amyloodinium ocellatum*, an Important Parasite of Cultured Marine Fish. Southern Regional Aquaculture Center. 4705: 1 – 12.
- Grant, A.N. (2002) Medicines for sea lice. *Pest Management Science*. 58: 521-527.
- Hancock, R. E. e Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*. 16: 82-88.
- Henrique, M. M. F., Morris, P. C., Davies, S. J. (1996) Vitamin C status and physiological response of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L., to stressors associated with aquaculture. *Aquaculture Research*. 27: 405-412.
- Henrique, M. M. F. (2000) Importância nutricional do ácido ascórbico e sua influência na fisiopatologia do stress em dourada (*Sparus aurata*). Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto para obtenção do grau de doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de nutrição. 151p.
- Hemre, G.I., Lambertsen, G., Lie, O. (1991) The effect of dietary carbohydrate on stress response in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 95: 319-328.
- Hwang, P. P., Sun, C. M., Wu, S. M. (1989) Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na-K-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation. *Marine Biology*. 100: 295-299.
- Imslund, A. K., Gunnarsson, S., Foss, A., Stefansson, S. O. (2003) Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture*. 218: 671-683.
- Kuperman, B. I. e Matey, V. E. (1999) Massive infestation by *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida) of fish in a highly saline lake, Salton Sea, California, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*. 39 (1):65-73.
- Laidley, C. W., Woo, P. T. K., Leasherland, J. F. (1988) The stress response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *Journal of Fish Biology*. 32: 253-261.
- Laiz-Carrión, R., Guerreiro, P. M., Fuentes, J., Canario, A. V. M., Ríó, M. P. M. D., Mancera, J. M. (2005) Branchial Osmoregulatory Response to Salinity in the Gilthead Sea Bream, *Sparus auratus*. *Journal of experimental zoology*. 303A:563–576.
- Landsberg, J. H., Blakesley, B. A., Reese, R. O., McRae, G., Forstchen, P. R. (1998) Parasites of fishes as indicators of environmental stress. *Environmental Monitoring and Assessment*. 51: 211–232.

- Landsberg, J. H., Smith, S. A., Noga, E. J., Richard, S. A. (1992) Effect of serum and mucus of blue tilapia *Oreochromis aureus* on infectivity of the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* in cell culture. *Fish Pathology*. 27: 163-169.
- Landsberg, J.H., Steidinger, K.A., Blakesley, B.A., Zondervan, R.L. (1994) Scanning electron microscope study of dinospores of *Amyloodinium ocellatum*, a pathogenic dinoflagellate of marine fish, and comments on its relationship to the Peridinales. *Diseases of Aquatic Organisms*. 20:23-32.
- Lekang, O. (2007) *Aquaculture Engineering*. Blackwell Publishing: 354.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honinberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Loin, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Polyanski, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F. G. (1980) A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozol*. 27:37-58.
- Levy, M. G., Poore, M. F., Colorni, A., Noga, E. J., Vandersea, M. W., Litaker, R. W. (2007) A highly specific PCR assay for detecting the fish ectoparasite *Amyloodinium ocellatum*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 73 (3).
- Lewis, D.H., Wenxing W., Ayers, A. and Arnold, C.R. (1988) Preliminary studies on the use of chloroquine as a systemic chemotherapeutic agent for amyloodinosis in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Contributions in Marine Science* 30 (suppl.). 183–189.
- Lichtstein, D, Gati, I., Haver, E., Katz, U. (1992) Digitalis-like compounds in the toad *Bufo viridis*: tissue and plasma levels and significance in osmotic stress. *Life Sciences*. 51(2):119-28.
- Mancera, J. M., Pérez-Fígares, J. M., Fernández-Llebrez, P. (1994) Effect of cortisol on brackish water adaptation in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry Physiology*. 107A (2): 397-402.
- Masson, I., Blaylock, R. B., Lotz, J. M. (2011) Susceptibility and Tolerance of Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus*, and Red Snapper, *Lutjanus campechanus*, to Experimental infections with *Amyloodinium ocellatum*. *Journal of Parasitology*. 97(4):577-585.
- McCormick, S.D. (1993) Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50: 656–658.
- Menezes, J. (2000) Parasitoses. In: *Manual sobre Doenças de Peixes Ósseos*. Publicações Avulsas do IPIMAR. 3: 75 - 114.
- Molinero, A. e Gonzalez, J. (1995) Comparative Effects of MS 222 and 2-Phenoxyethanol on Guilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) during Confinement. *Comparative Physiology and Biochemistry*. 111 A: 405-414.
- Montgomery-Brock, D. R., Sylvester, J. Y., Tamaru, C. S., Brock, J. A. (2000) Hydrogen peroxide treatment for *Amyloodinium sp.* on mullet (*Mugil cephalus*) fry. *Aqua Tips*,

- Regional Notes, Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, Waimanalo, HI. 11(4):4-6.
- Montgomery-Brock, D., Brock, J. A., Tamaru, C. S. (2001) The application of hydrogen peroxide as a treatment for ectoparasite *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) on the Pacific threadfin, *Polydactylus sexfilis*. Journal World Aquaculture Society. 32: 250-254.
- Noga, E. J. (2012) *Amyloodinium ocellatum*. IN: Fish parasites : pathobiology and protection. edited by Patrick T.K. Woo, Kurt Buchmann. CAB International: Oxford, UK. 2: 19-29.
- Noga, E.J., Fan, Z., Silphaduang, U. (2001) Histone-like proteins from fish are lethal to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*. Parasitology, 123: 57-65.
- Noga, E.J. e Levy, M.G (2006). Phylum Dinoflagellata. IN: Fish Diseases and Disorders, Volume I: Protozoan and Metazoan Infections, P.T.K. Woo (ed). CAB International: Oxford, UK. 16-45.
- Noga, E. J. (1987) Propagation in cell culture of the Dinoflagellate *Amyloodinium*, an ectoparasite of marine fishes. Science. 236 (4806):1302-1304.
- Oestmann, D. J. e Lewis, D. H. (1995) A method for producing microbe-free *Amyloodinium ocellatum* (Brown) with Percoll®. Veterinary Parasitology. 59 (2):169-175.
- Oestmann, D. J. e Lewis, D. H. (1996) Improved cell culture propagation of *Amyloodinium ocellatum*. Diseases of Aquatic Organisms. 24 (3):173-178.
- O'Neill, P. M. , Barton, V. E., Ward, S. A. (2010) The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues. Molecules. 15: 1705-1721.
- Opsenica, D. M. e Šolaja, B. A. (2009) Review Antimalarial peroxides. Journal of the Serbian Chemical Society. 74 (11): 1155–1193.
- 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.
- Paperna, I. (1984a) Chemical control of *Amyloodinium ocellatum* (Brown 1931) (Dinoflagellida) infections – in vitro tests and treatment and treatment trials with infected fishes. Aquaculture. 38 (1):1-18.
- Paperna, I. (1984b) Reproduction cycle and tolerance to temperature and salinity of *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida). Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee. 59 (1):7-30.
- 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.
- Plant, K. P. e LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish delivery. Developmental and Comparative Immunology. 35: 1256-1262.

- Plum, J. A. (2001) Disease recognition and diagnosis of fish in Modern Aquaculture in the Coastal Zone: Lessons and Opportunities. Isos press. 145-154.
- Ramos, P. e Oliveira, J.M. (2001) Amiloodiniose em pregado, *Psetta maxima* (L.) Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 96: 201-205
- Rand, T. G. e Cone, D. K. (1990) Effects of *Ichthyophonus hoferi* on condition indices and blood chemistry of experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Wildlife Diseases. 26: 323-328.
- Roberts-Thomson, A., Barnes, A., Fielder, D. S., Lester, R. J. G., Adlard, R. D. (2006) Aerosol dispersal of the fish pathogen, *Amyloodinium ocellatum*. Aquaculture. 257 (1-4):118-123.
- Rotllant, J., Guerreiro, P.M., Anjos, L., Redruello, B., Canario, A.V.M., Power, D.M. (2005) Stimulation of cortisol release by the N terminus of teleost parathyroid hormone-related protein in interregal cells in vitro. Endocrinology. 146:71-76.
- Santos, B. G. (2011) Uso do medicamento homeopático Sulphor no controle do *Amyloodinium sp.* em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766). Dissertação apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. 101p.
- Saraiva, A., Jerónimo, D., Cruz, C. (2011) *Amyloodinium ocellatum* (Chromalveolata: Dinoflagellata) in farmed turbot. Aquaculture. 320: 34-36.
- Severino, R. B. A. (2008) Contributo para o conhecimento do ciclo de vida de *Amyloodinium ocellatum* e seu controlo em piscicultura. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 52p.
- Smith, S. A., Noga, E. J., Levy, M. G., Gerig, T. M. (1993). Effect of serum from tilapia *Oreochromis aureus* immunized with the dinosporo *Amyloodinium ocellatum* on the motility, infectivity and growth of the parasite in cell culture. Diseases of Aquatic Organisms. 15 (1).
- Stone, J., Sutherland, I. H., Sommerville, C., Richards, R. H., Endris, R. G. (2000) The duration of efficacy following oral treatment with emamectin benzoate against infestations of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer), in Atlantic salmon *Salmo salar* L. Fish Diseases. 23: 185-192.
- Soares, F., Quental Ferreira, H., Cunha, E., Pousão-Ferreira, P. (2012a) Occurrence of *Amyloodinium ocellatum* in aquaculture fish production. Aquaculture Europe. 36(4): 13-16.
- Soares, F., Quental-Ferreira, H., Moreira, M., Cunha, E., Ribeiro, L., Pousao-Ferreira, P. (2012b) First report of *Amyloodinium ocellatum* in farmed meagre (*Argyrosomus regius*). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 32 (1):30-33.

- Tojo, J. L. e Santamarina, M. T. (1998) Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. 11: Gyrodactylus sp. Diseases of Aquatic Organisms. 33 : 187 – 193.
- Ullal, A. J. (2006) Extraerythrocytic expression of the  $\beta$ -subunit of hemoglobin is associated with a potent anti-parasitic defense in fish. A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. 148p.
- Vaz, C. L. O. (2010) Efeitos do cobre no sargo (*Diplodus sargus*, Linnaeus 1758): implicações quer a nível fisiológico, quer de crescimento. Dissertação de mestrado em Engenharia Zootécnica – Produção animal apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade técnica de Lisboa. 119p.
- Virgnes, R. (2000) Dimethyl Sulfoxide (DMSO) a “new” clean, nique, superior solvent. American Chemical Society. 20.
- Weisberg, L. S. (1989) Pseudohyponatremia: a reappraisal. American Journal of Medicine.86:315-318
- Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T. (2008) Vander's Human Physiology. 11th Ed.. McGraw-Hill. 108–120.
- Williams, R. E. (2009) Oral treatment for monogenean parasites of farmed yellowtails, *Seriola spp.* (Carangidae). Presented for the degree of Doctor of Philosophy School of Earth and Environmental Sciences The University of Adelaide, South Australia.
- Woo, P. T. K. (2007) Protective immunity in fish against protozoan diseases. Parassitologia. 49 (3).
- Yang, C. (2005) Studies on the cryopreservation and in vitro culture of *Amyloodinium ocellatum*. Master's Thesis National Sun Yat-sen University. 63p.
- Zambrano, J.L.F., Dezón, D.E., González, C.R., Fermín, E.G. (2001) Ciclo de vida de *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellata: Oodinidae). Boletín Oceanográfico, 83-89.