



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MARIANE DOS SANTOS AGUIAR LUZ

**Infecção e potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. em
ostras *Crassostrea* spp. no litoral da Bahia**

ILHÉUS, BAHIA

2018

MARIANE DOS SANTOS AGUIAR LUZ

Infecção e potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. em ostras *Crassostrea* spp. no litoral da Bahia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linhas de Pesquisa: Produção e Sanidade Animal

Orientadora: Prof^a Dr^a. Guisla Boehs

ILHÉUS, BAHIA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

MARIANE DOS SANTOS AGUIAR LUZ

**Infecção e potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. em
ostras *Crassostrea* spp. no litoral da Bahia**

Ilhéus (BA), 08/02/2018

Dra. Guisla Boehs
UESC/DCB
(Orientadora)

Dr. Amauri Arias Wenceslau
UESC/DCAA

Dr. Eduardo Koji Tamura
UESC/DCB

Dr. Juneo Freitas Silva
UESC/DCB

Dra. Rachel Costa Sabry
IFCE

Dedicatória

Dedico a todas as mulheres que são e fazem ciência.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por toda a sua bondade! Por me permitir fechar um ciclo acadêmico que comecei há exatos 10 anos. Sou muito grata por tudo que conheci, pelos caminhos que se cruzaram ao meu. Tenho plena certeza que nada do que aconteceu e as pessoas que conheci não foram por acaso! A Tua mão sempre foi comigo e te agradeço bom Deus!

Agradeço imensamente à minha orientadora Guisla Boehs, por todo o aprendizado proporcionado nos anos em que estivemos juntas. Conhecimentos não somente relacionados aos aspectos acadêmicos, mas à vida e como ela se desdobra. Durante nove anos passamos por muitas coisas e vários momentos... Momentos estes em que senti não somente crescimento de minha parte, mas também da dela. Senti que se abriu e se permitiu ao desafio de me lapidar e acreditar que eu conseguiria chegar mais longe. Você é exemplo de ética, esforço pessoal e determinação para a vida. Sou eternamente grata pelas oportunidades proporcionadas e por tantas outras coisas que não conseguiria expressar nesse pequeno trecho de uma imensa pintura que construímos juntas! Obrigada mais uma vez!

Obrigada ao meu esposo pelo carinho e dedicação, pelas vezes em que tive que ficar... pelas vezes em que não pudemos ir. Grata sou pela sua amizade e apoio. Por ter me incentivado firmemente em prosseguir e concluir esse sonho, sem você não conseguiria. Te amo!

Agradeço a minha família (Mariano, Esdras, Mariana e Elsimar, Laryssa, Denise, Senir) pela torcida e pelo orgulho demonstrado em me tornar “doutora”. Amo muito vocês!

Minha gratidão à família que me “adotou” Martinha, Sônia e Tércio Luz.

Muito obrigada a minha amiga e colega de doutorado e mestrado Daniele Rocha. Obrigada por ser exemplo de dedicação, profissionalismo e competência. Por toda a paciência e ajuda dispendida. Por levantar meu astral nos momentos em que senti que estava por desanimar. Grata por tudo de modo muito verdadeiro e genuíno.

A Leiza, minha amiga que caminhou comigo na graduação e mesmo em caminhos diferentes também no doutorado e mestrado. Você é a prova de que tudo pode dar certo com muito esforço e dedicação. Amo você, chuchu!

Agradeço a equipe do Laboratório de Moluscos Marinhos, em especial a Verena, Gabriela e Gláucia. Vocês são meninas/mulheres das quais sinto muito orgulho e me inspiro pra entender e sentir que tudo na vida é superável.

Agradeço a Thaína Macedo por todo auxílio e alto astral com o experimento com camundongos. Obrigada!

Agradeço aos amigos (Elaine, Helbert, Aninha, Josi, Camille, Gleisson, Stephanie, Gabriel, Raquel, Letícia), e também família emprestada, do Espaço Novo Tempo de Ilhéus. Obrigada pelo carinho, pelas palavras de apoio, orações a meu favor e também pela torcida. Fazer o bem transforma... Quero estar sempre à disposição desse propósito.

As minhas lindas amigas do Vocal Concentus (Lane, Laís, Emilly, Ilka, Bete e Joelma), pelas cantorias, conversas, descontrações, mas principalmente pela amizade tão especial e verdadeira. Pelo apoio e palavras de estímulo quando sempre precisei. Amo muito vocês!

Aos meus amigos Lidna e Luís pela torcida, amizade e tanto afeto.

Agradeço a Augusta Miranda (Tuti) pelo apoio nas questões de laboratório.

Grata aos professores George e Amauri por permitirem o uso de seus respectivos laboratórios. Em especial ao professor Amauri pelas contribuições na banca de defesa e por ser essa pessoa tão singular e especial. Obrigada!

À professora Bianca Maciel pelas palavras sempre positivas, por ser tão querida e leve em tantos momentos. Por trazer calma e leveza não somente a mim, mas a tantos outros que nos cercam. Você é um ser humano único.

Ao professor Juneo Silva, pela ajuda com as análises histopatológicas, ensinamentos e por aceitar participar e contribuir em minha banca de qualificação.

Ao professor Gustavo Braga pelas considerações e por aceitar participar na banca de qualificação.

Agradeço a professora Rachel Sabry pelas contribuições na banca de defesa e por ser tão solícita, não somente no doutorado, mas em tantos outros momentos.

Ao professor Eduardo Tamura por ter aceitado participar e contribuir na banca de defesa. Muito Grata!

A Karin Seger pelo auxílio nas minhas dúvidas quanto à filogenia, pela amizade e torcida. Sinto muito a sua falta!

Aos pescadores da comunidade de Porto do Campo, Cajaíba, Graciosa, Canavieiras e Ilhéus, pelas ostras coletadas e por todo conhecimento transmitido. Vocês também são a razão desse trabalho.

Aos camundongos e ostras utilizadas nesse projeto. A ciência caminhou mais um pouco e vocês são participantes.

A FAPESB pela concessão da bolsa de doutorado.

A UESC e ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, em especial a Eduardo, por ser tão prestativo.

Ostras são moluscos, animais sem esqueletos, macias, que são as delícias dos gastrônomos. [...] são animais mansos - seriam uma presa fácil dos predadores. Para que isso não acontecesse a sua sabedoria as ensinou a fazer casas, conchas duras, dentro das quais vivem.

Rubem Alves

Infecção e potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. em ostras *Crassostrea* spp. no litoral da Bahia

RESUMO

O estado da Bahia apresenta uma extensa faixa litorânea, com vários estuários e baías, que favorecem o estabelecimento de cultivos de moluscos bivalves. Para essa atividade, é necessário conhecer a biologia e a ecologia das espécies, assim como de organismos associados a estes, alguns dos quais podem causar enfermidades e conseqüentemente prejuízos à atividade de cultivo. Dentre os patógenos de moluscos bivalves estão os protozoários dos gêneros *Perkinsus* Levine, 1978 (Perkinsozoa) e *Nematopsis* Schneider, 1892 (Apicomplexa), sendo que o primeiro pode causar mortalidades em massa. Neste estudo teve-se por objetivos: (1) identificar as espécies nativas de ostras no estado da Bahia; (2) verificar a presença de *Perkinsus* em cada espécie, assim como a sua prevalência, intensidade de infecção e a correlação com a salinidade e (3) avaliar as alterações causadas por *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. em camundongos Swiss (*Mus musculus*), via infecção experimental, para avaliação do potencial zoonótico desses protozoários. Para o primeiro objetivo, foram coletadas 320 ostras em 12 estações amostrais no centro-sul da Bahia, em bancos naturais de ostras, estruturas artificiais e em cultivos. A identificação foi feita com uso das ferramentas moleculares PCR, PCR-RFLP, sequenciamento de DNA e análise filogenética. Exceto pelo tamanho, não foram observadas diferenças morfológicas entre as espécies. As análises genéticas evidenciaram a presença de duas espécies de ostras na região: *Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar* (= *C. brasiliiana*). Para o segundo objetivo, 240 ostras *Crassostrea* spp. foram coletadas em oito locais do litoral sul da Bahia. As amostras foram submetidas ao cultivo Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), técnica histológica, PCR e sequenciamento de DNA. *Perkinsus beihaiensis* foi detectada nas duas espécies de ostras, com prevalência média de 82,8% via análise histológica e de 65,2% via RFTM em *C. rhizophorae* e de 70,5% e 35,7%, respectivamente, em *C. gasar*. A prevalência mais baixa foi observada em *C. gasar* e esta pode ter sido influenciada pelo hábitat e pela salinidade. Em ambas as espécies, este patógeno localizou-se principalmente no epitélio gástrico e intestinal, onde ocasionou, em casos de infecção severa, reação hemocitária. Tanto a prevalência quanto o nível de infecção estiveram positivamente correlacionados com a salinidade ($r = > 0,8$; $p < 0,05$), que variou de 18 a 36‰, considerando-se todos os locais. Para avaliar os possíveis efeitos de *P. beihaiensis* e de *Nematopsis* sp. no humano, foi realizado um bioensaio com camundongos Swiss. Foram preparados *pools* da ostra *C. rhizophorae*, que foram submetidos à digestão péptica e depois inoculados nos camundongos por via intraperitoneal. Foram utilizados três grupos (G1-G3) com oito animais cada, que foram eutanasiados em intervalos de 15 (G1), 30 (G2) e 45 (G3) dias após a inoculação, sendo que do total, 6 animais eram o controle. Os camundongos foram monitorados durante todo o experimento quanto a sinais clínicos. Foram coletadas amostras de tecidos de vários órgãos, que foram analisados via histologia, RFTM e por ferramentas moleculares. Nos animais inoculados observou-se alteração de peso do baço e do fígado, além da presença de nódulos, principalmente no fígado. Na análise microscópica por RFTM evidenciou-se *P. beihaiensis*, com prevalência de até 100% em alguns animais. Esse patógeno foi associado a alterações nos nódulos linfóides do intestino (Placas de Peyer). Oocistos de *Nematopsis* sp. foram observados no fígado, causando infiltrado inflamatório. Os resultados sugerem um potencial zoonótico de ambos os patógenos. Com base nisso, recomenda-se monitoramentos costeiros mais frequentes e atenção para a qualidade sanitária das ostras para o consumo humano.

Palavras-chave: Apicomplexa; bioensaio; moluscos; *Mus musculus*; Perkinsiose; potencial zoonótico; saúde humana.

**Infection and zoonotic potential of *Perkinsus beihaiensis* and *Nematopsis* sp. in oysters
Crassostrea spp. on the coast of Bahia**

ABSTRACT

The State of Bahia has an extensive coastline, with several estuaries and bays, which favor the establishment of cultivation of bivalve molluscs. For this activity, it is necessary to know the biology and ecology of the species, as well as organisms associated with them, some of which can cause diseases and consequently damage to the cultivation activity. Among the bivalve mollusc's pathogens is the protozoan *Perkinsus* Levine, 1978 (Perkinsozoa) and *Nematopsis* Schneider, 1892 (Apicomplexa), being that the former can cause mass mortalities. In Brazil, four species of this genus have already been recorded. In this study, the objectives were: (a) to identify native oyster species in the state of Bahia; (2) to verify the presence of *Perkinsus* in each species, as well as their prevalence, infection intensity and correlation with salinity; and (3) to evaluate the changes caused by *Perkinsus beihaiensis* and *Nematopsis* sp. in Swiss mice (*Mus musculus*), via experimental infection, in order to evaluate the zoonotic potential of these protozoa. For the first objective, 320 oysters were collected in 12 sampling stations, in natural oyster beds, in artificial structures and in crops. Identification was made using the molecular tools PCR, PCR-RFLP, DNA sequencing and phylogenetic analysis. Except for size, no morphological differences were observed between species. Genetic analysis revealed the presence of two species of oysters: *Crassostrea rhizophorae* and *C. gasar* (= *C. brasiliensis*). For the second objective, 240 oysters *Crassostrea* spp. were collected from eight sites on the south coast of Bahia. Samples were submitted to Ray thioglycollate culture (RFTM), histological technique, PCR and DNA sequencing. *Perkinsus beihaiensis* was detected in both species of oysters, with a mean prevalence of 82.8% via histological analysis and of 65.2% via RFTM in *C. rhizophorae* and 70.5% and 35.7%, respectively, in *C. gasar*. The lowest prevalence was observed in *C. gasar* and this may have been influenced by habitat and by salinity. In both species, the pathogen was mainly located in the gastric and intestinal epithelium, where it caused, in cases of severe infection, hemocyte response. Both the prevalence and the level of infection were positively correlated with salinity ($r = 0.8$, $p < 0.05$), which ranged from 18 to 36‰, considering all sites. To evaluate the possible effects of *P. beihaiensis* and *Nematopsis* sp. on humans, a bioassay was performed with Swiss mice. Pools of the *C. rhizophorae* were prepared, which were subjected to peptic digestion and then inoculated into the mice by intraperitoneal route. Three groups (G1-G3) with eight animals each were used, which were euthanized at intervals of 15 (G1), 30 (G2) and 45 (G3) days after inoculation, of which 6 animals were the control. Mice were monitored throughout the experiment for clinical signs. Samples of tissues from various organs were collected, which were analyzed by histology, RFTM and by molecular tools. In the inoculated animals, it was observed a change in spleen and liver weight, besides the presence of nodules, mainly in the liver. Microscopic analysis by RFTM revealed *P. beihaiensis*, with prevalence of up to 100% in some animals. This pathogen was associated with changes in intestinal lymphoid nodules (Peyer's patches). Oocysts of *Nematopsis* sp. were observed in the liver, causing inflammatory infiltrate. Therefore, the results suggest a zoonotic potential of both pathogens. Based on this, more frequent coastal monitoring and attention to the sanitary quality of oysters for human consumption is recommended.

Keywords: Apicomplexa; bioassay; human health; molluscs; *Mus musculus*; Perkinsiose; zoonotic potential.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Valvas de *Crassostrea rhizophorae*, sendo: à esquerda: valva direita, vista externa e à direita, valva esquerda, vista interna.....30
- Figura 2.** Valvas de *Crassostrea gasar* (= *C. brasiliiana*), sendo: à esquerda: valva direita, vista externa e à direita, valva esquerda, vista interna.....30
- Figura 3.** Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* na ostra *Crassostrea virginica*. Fonte: Fernández-Robledo (2015), editado.....41
- Figura 4.** *Perkinsus beihaiensis* na ostra *Crassostrea rhizophorae*, mostrando em A trofozoíto e em B rosetas, indicados, respectivamente, por setas, Barras = 10 µm. Fonte: Luz e Boehs, 2016.....42
- Figura 5.** Hipnósporo de *Perkinsus beihaiensis* na ostra *Crassostrea rhizophorae* em aumentos de 40x e 10x (figuras A e B, respectivamente). Barras: 25 µm, respectivamente. Fonte: Luz, 2014.....42
- Figura 6.** Processo de zoosporulação (fase Zoosporângio) de *Perkinsus olseni*. A. Zoosporângio unicelular mostra o tubo de descarga (seta); B. com 2 células; C. com 4 células; D. em divisão, correspondente à transição entre 4 e 8 células; E. com 8 células; F. com 16 células; G. com zoósporos móveis; H. Liberação dos zoósporos. Fonte: Villalba et al., 2011, editado.....43
- Figura 7.** Ciclo de vida de *Nematopsis ostrearum* na ostra *Crassostrea virginica*. 1: Oocisto contendo um único esporozoíto; 2: Esporozoíto eclodindo de esporos no intestino de um caranguejo; 3: Adesão ao epitélio do intestino do hospedeiro; 4: Desenvolvimento em trofozoíto; 5: Associação de trofozoítos; 6: Reajuste temporário ao epitélio intestinal; 7: desenvolvimento em gamonte maduro; 8-9: Estágio seguido por

fixação ao reto do caranguejo; 10: Formação de gametocistos; 11: Libertação de gimnósporos de ruptura do gametocisto; 12: gimnósporo único; 13: engolfamento de gimnósporos por fagócitos de ostras e interrupção desse estágio; 14-16: crescimento de esporozoítos dentro de fagócitos; 17: formação de oocistos resistentes dentro de fagócitos. Adaptado de Lauckner, 1983.....49

CAPÍTULO 2 - Ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 no estado da Bahia, Brasil

Figura 1. Mapa da área de estudo, indicando as estações de coleta (St1-St12).....72

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose (2%) com ampliações de fragmentos de 530 bp, obtidos em PCR para a identificação das ostras. A primeira linha superior mostra o marcador molecular (M), seguido pelo controle positivo (C+), negativo (C-) e as amostras (1, 2, 3, 5, 6), todas positivas.....76

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (2%) com ampliações de fragmentos de 230 bp e 260 pb obtidos em PCR- RFLP para a identificação das ostras. M= Marcador molecular Cr = *Crassostrea rhizophorae*; Cg = *C. gasar*.....77

Figura 4. Árvore filogenética obtida a partir do Método de Neighbor-Joining para os gêneros *Crassostrea* e *Saccostrea cucullata* com base em 16S rRNA, com inclusão das ostras deste estudo. *Ostrea edulis* foi utilizada como grupo externo.....78

Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do Método da Parsimônia para os gêneros *Crassostrea* e *Saccostrea cucullata* com base em 16S rRNA, com inclusão das ostras deste estudo. *Ostrea edulis* foi utilizada como grupo externo.....79

CAPÍTULO 3 - *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) em ostras do Litoral Sul da Bahia

Figura 1. Mapa da área de estudo, com a indicação dos pontos de coleta (St1-St8).....89

Figura 2. Frequência absoluta dos níveis de intensidade de infecção* de *Perkinsus beihaiensis* nas ostras *Crassostrea rhizophorae* (Cr) e *C. gasar* (Cg) do litoral sul da Bahia, observados em microscopia de luz após cultivo em Fluído de Tioglocolato de Ray

- RFTM. N = 240. * Níveis de infecção segundo classificação de Ray (1954), onde: Infecção nula: nenhum hipnósporo em toda a lâmina (100 x) (=N0); Infecção muito baixa: menos de 10 hipnósporos em toda a lâmina (100 x) (=N1); Infecção baixa: 11-100 hipnósporos em toda a lâmina (100 x) (=N2); Infecção moderada: ao menos 40 hipnósporos observados em 10 diferentes campos (400 x) (=N3); Infecção severa: mais de 40 hipnósporos observados em 10 diferentes campos (400 x) (=N4).....96

Figura 3. Resultado gráfico da Análise de Componentes Principais (PCA), evidenciando correlação positiva entre a prevalência (P) e intensidade de infecção (níveis 0-4) de *Perkinsus beihaiensis* com a salinidade (S) nas ostras *Crassostrea rhizophorae* (Cr) e *C. gasar* (Cg). St = estações amostrais (St1-St8).....97

CAPÍTULO 4 – Avaliação do potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. em *Mus musculus*

Figura 1. Alterações macroscópicas em camundongo Swiss infectado experimentalmente com *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. A) hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço); B) Presença de membrana fina sobre o fígado (cabeça de seta) e formação de pequenos nódulos (*); C) Nódulo no intestino (seta); D) Nódulos no fígado (cabeça de seta).....115

Figura 2. Oocistos de *Nematopsis* sp. (seta) no fígado do camundongo Swiss infectado experimentalmente. Aumento116

Figura 3. Hipnósporos no camundongo Swiss infectado experimentalmente com pool de ostras com *Perkinsus beihaiensis*. Barra= 25 µm.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Espécies de *Perkinsus* relatadas para a América do Sul..... 39

CAPÍTULO 2 - Ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 no estado da Bahia, Brasil

Tabela 1. Informações sobre os números de acesso no GenBank utilizados para as análises filogenéticas deste estudo.....75

Tabela 2. Locais de coleta (=St, dispostas no sentido norte-sul) com as respectivas coordenadas e municípios de localização e espécie (s) de ostras encontradas em cada estação amostral. A letra “a” indica ostras coletadas de estoque natural, sobre raízes e caules de *Rhizophorae mangle*; a notação “a*” indica ostras de estoques naturais incrustadas sobre rochas e estruturas artificiais de concreto; “a**” indica ostras provenientes de estoques naturais, aderidas na parte mais basal das raízes de *R. mangle* ou parcialmente enterradas no sedimento (St12); a letra “b” = ostras de cultivo do tipo tabuleiro ou mesa; a letra “c” indica ostras de cultivo em sistema espinhel.....80

CAPÍTULO 3 - *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) em ostras do Litoral Sul da Bahia

Tabela 1. Informações sobre as estações de coleta (coordenadas, localização e dados pontuais de temperatura e salinidade) e resultados de prevalência (P) de *Perkinsus beihaiensis* em duas espécies de ostras no litoral sul da Bahia, para 240 exemplares coletados entre outubro e dezembro de 2014 e analisados por histologia e Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), sendo: - Ausência da espécie ou de dados; Cg = *Crassostrea gasar*; Cr = *Crassostrea rhizophorae*; S = salinidade; T = temperatura.....94

CAPÍTULO 4. Avaliação do potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. em *Mus musculus*

Tabela 1. . Resultados numéricos de peso do baço, fígado e rins (média e desvio padrão), comparações pelo teste Kruskal-Wallis (valores de p) de camundongos Swiss (*Mus musculus*) inoculados com produto de digestão péptica contendo *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. após 15, 30 e 45 dias e comparações, com as respectivas alterações macro e microscópicas em cada grupo e prevalências. I = inoculados; C = controle; n total = 24.114

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	22
Objetivo geral.....	22
Objetivos específicos.....	22
Capítulo 1 - REVISÃO DE LITERATURA	25
Produção de bivalves no Brasil	26
Ostras do gênero <i>Crassostrea</i> no Brasil.....	27
Parasitismo	30
Patógenos de moluscos de notificação obrigatória	31
O protozoário <i>Perkinsus</i>	31
Histórico e aspectos de taxonomia	32
Espécies descritas.....	33
<i>Perkinsus olseni</i>	33
<i>Perkinsus marinus</i>	34
<i>Perkinsus chesapeaki</i>	35
<i>Perkinsus mediterraneus</i>	35
<i>Perkinsus honshuensis</i>	35
<i>Perkinsus qugwadi</i>	35
<i>Perkinsus beihaiensis</i>	36
<i>Perkinsus</i> na América do Sul e no Brasil	36
Transmissão de <i>Perkinsus</i> spp.	39

Ciclo de Vida	39
Sintomas e patogenia da Perkinsiose	42
Aspectos epidemiológicos	43
Influência dos fatores ambientais	43
Influências de fatores de estresse e idade	44
Métodos Diagnósticos	45
Meio Fluido de Tioglicolato de Ray – RFTM.....	45
Histologia.....	46
Métodos moleculares.....	47
<i>Nematopsis</i> Schneider, 1892.....	47
Protozoários patogênicos de veiculação hídrica e alimentar.....	49
Referências bibliográficas.....	51
Capítulo 2 – Ostras do gênero <i>Crassostrea</i> Sacco, 1897 no Estado da Bahia, Brasil.....	67
Introdução	69
Material e Métodos	70
Resultados.....	75
Discussão	79
Referências Bibliográficas	81
Capítulo 3 – <i>Perkinsus beihaiensis</i> (Perkinsozoa) em ostras do Litoral Sul da Bahia.....	85
Introdução	87
Material e Métodos.....	88

Resultados	91
Discussão	96
Referências Bibliográficas.....	99
Capítulo 4 – Avaliação do potencial zoonótico de <i>Perkinsus beihaiensis</i> e <i>Nematopsis</i> sp. em <i>Mus musculus</i>	102
Introdução.....	105
Material e Métodos	106
Resultados.....	110
Discussão	115
Referências Bibliográficas.....	119
CONCLUSÕES GERAIS.....	125
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
APÊNDICES.....	128
ANEXOS.....	136

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de pescado via aquicultura, incluindo moluscos e outros organismos aquáticos, passou de 32,4 para 66,6 milhões de toneladas/ano nos últimos 22 anos (FAO, 2016). Dentre os moluscos, cultivam-se principalmente bivalves marinhos. Dentre as espécies já cultivadas no País, destacam-se ostras, mexilhões e vieiras (IBGE, 2014).

Crassostrea rhizophorae (Guilding, 1828) e *C. gasar* (= *C. brasiliana*) (Lamarck, 1819) são ostras nativas da costa brasileira. A primeira, denominada de ostra-do-mangue, ocorre desde o sul do Caribe até a costa do Uruguai e está presente em toda a costa brasileira (RIOS, 2009). Essa espécie fixa-se sobre substratos consolidados, incluindo rochas, mas seu hábitat preferencial é sobre as raízes do mangue vermelho *Rhizophora mangle* L. (NASCIMENTO, 1983). Já *C. gasar*, a “ostra de fundo” (LEGAT et al., 2017) é também comumente encontrada sobre substratos consolidados ou nas raízes do mangue em regiões mais rasteiras, isto é, em níveis de maré mais baixos ou no sublitoral. Apresenta tamanho maior em relação a *C. rhizophorae*, crescendo até 19 cm de altura de concha (LAZOSKI et al., 2011) e também melhor desempenho (crescimento) em cultivo (PEREIRA et al., 2003).

As ostras, assim como os demais bivalves, possuem hábito filtrador como modo de captação de partículas para obter alimentos. Em *C. rhizophorae*, esse mecanismo permite a filtração de cerca de cinco litros de água por hora (BARROS et al., 2005), água esta que pode conter protozoários e outros organismos patogênicos (PEREIRA et al., 2006) de veiculação hídrica e alimentar, que podem conduzir a um estado de doença ou enfermidade tanto o bivalve quanto o consumidor.

A ocorrência de patógenos em moluscos bivalves pode ser um fator inibidor para a produção, pois estes podem causar recorrentes mortalidades e conseqüentemente perdas na produção (BOWER et al., 1994), representando um fator limitante tanto para a manutenção do cultivo, bem como a comercialização desses produtos.

Os principais agentes patológicos em bivalves de interesse econômico incluem representantes de vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários (BOEHS et al., 2012). Entre os grupos mencionados, os protozoários são os mais relevantes, devido aos danos aos bivalves (BOWER et al., 1994; VILLALBA et al., 2011).

Protozoários do gênero *Perkinsus* (Phylum Perkinsozoa) são responsáveis por danos e mortalidades em moluscos bivalves em diversas partes do mundo (VILLALBA et al., 2011). Assim, das sete espécies descritas e reconhecidas no gênero, quatro já foram registradas no país: *P. marinus*, *P. olsenii*, *P. beihaiensis* e *P. chesapeakei*, sendo as duas primeiras de declaração obrigatória a Organização Mundial da Saúde Animal (*World Animal Health Organization = Office International des Épizooties - OIE*). Os estudos no Brasil sobre esse patógeno foram realizados apenas na última década. Estes permitiram, além de identificar as espécies presentes e principais hospedeiros, a obtenção de informações sobre as prevalências, os níveis de infecção, assim como conhecer alguns aspectos da ecologia do patógeno.

O gênero *Nematopsis* (Apicomplexa) engloba protozoários parasitos intrahemocíticos, tendo como forma infectante a fase de vida de oocisto; já foi relatado em diversas regiões do mundo parasitando diversas espécies de bivalves de interesse econômico, que utiliza os moluscos bivalves como hospedeiros intermediários, completando o seu ciclo de vida no trato digestivo de crustáceos (LAUCKNER, 1983).

Apesar de ambos os protozoários (*Perkinsus* e *Nematopsis* sp.) tendo sido relatados há alguns anos, alguns aspectos ainda necessitam ser elucidados, sendo um deles o potencial zoonótico.

Esta tese está apresentada em quatro capítulos, conforme sumarizado abaixo:

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

Nessa sessão, teve-se por objetivo revisar as informações disponíveis na literatura sobre os índices de produção via aquicultura, aspectos sobre as ostras

do gênero *Crassostrea* e infecção pelos patógenos *Perkinsus* e *Nematopsis*. Nessa sessão também foram abordados os registros de *Perkinsus* spp. no mundo e no Brasil e seus impactos sobre o cultivo de moluscos.

Capítulo 2 - Ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 no estado da Bahia, Brasil

Nesse capítulo, foram identificadas as espécies de ostras ocorrentes na costa da Bahia, utilizando-se ferramentas moleculares (PCR, PCR-RFLP) e análises filogenéticas.

Capítulo 3 - *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) em ostras do Litoral Sul Bahia

Esse capítulo relata a ocorrência de *Perkinsus beihaiensis* nas ostras *Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar* (= *C. brasiliana*) entre as latitudes 13°55'S e 15°42'S do litoral da Bahia. Aborda também aspectos de patogenia, níveis de infecção, prevalências e correlação com a salinidade. Para tais avaliações, foram utilizadas técnicas histológicas, meio de cultura em tioglicolato de Ray e ferramentas moleculares.

Capítulo 4 - Avaliação do potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. em *Mus musculus*

Nesse estudo, teve-se por objetivo verificar a infecção causada por *Perkinsus beihaiensis* e por *Nematopsis* sp. em camundongos Swiss (*Mus musculus*) via ensaio biológico por inoculação intraperitoneal. Para tal, foram analisadas alterações macro e microscópicas causadas pela inoculação dos parasitos e propostos intervalos de tempo de experimentação para avaliação da infecção.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a infecção natural de *Perkinsus beihaiensis* em ostras *Crassostrea* spp. e experimental deste e de *Nematopsis* sp. em camundongos Swiss.

Objetivos Específicos

- ✓ Identificar as espécies de ostras do gênero *Crassostrea* no litoral centro-sul da Bahia;
- ✓ Verificar os locais de ocorrência das espécies das ostras;
- ✓ Comparar, através de filogenia, as espécies de ostras ocorrentes na costa da Bahia com os registros anteriores no Brasil e mundo;
- ✓ Detectar a presença do patógeno *Perkinsus* em ostras da região;
- ✓ Verificar sinais macroscópicos relacionados à presença deste patógeno;
- ✓ Identificar a(s) espécie(s) de *Perkinsus* nas ostras da região;
- ✓ Comparar a prevalência da (s) espécie (s) identificada (s) nas ostras *Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar*;
- ✓ Comparar os níveis de infecção de *P. beihaiensis* em cada uma das espécies;
- ✓ Estabelecer correlação entre a salinidade e a prevalência/ níveis de infecção de *P. beihaiensis*;
- ✓ Verificar alterações macroscópicas em órgãos internos de camundongos Swiss infectados experimentalmente por *P. beihaiensis* e por *Nematopsis* sp.;
- ✓ Verificar alterações microscópicas em órgãos internos de camundongos Swiss por ambo os patógenos;
- ✓ Verificar respostas imunes associadas à infecção por *P. beihaiensis* e por *Nematopsis* sp.;
- ✓ Verificar o potencial zoonótico de *P. beihaiensis* e de *Nematopsis* sp. para o humano;
- ✓ Determinar intervalos experimentais como modelo para o humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, L.M.O.; THEOPHILO, G.N.D.; COSTA, R.N.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, R.H.S.F. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, p. 285-289, 2005.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O. Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M.L.A.; TAKEMOTO, R. (org.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos, Maringá, Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos**. 1º ed. Maringá: Massoni, Cap. 8. p. 165-193. 2012.

BOWER, S.M.; McGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 1-199, 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma. 224 p. 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 1-39, 2014.

LAUCKNER, G. **Diseases of Mollusca: Bivalvia**. In: KINNE, O. (ed). Diseases of marine animals. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. v. 2, 1983.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLE-CAVA, A.M. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series** v. 426, p. 197-212, 2011.

LEGAT, J.F.A.; PUCHNICK-LEGAT, A.; FOGAÇA, F.H.S.; TURECK, C.R.; SUHNEL, S.; MELO, C.M.R. Growth and survival of bottom oyster *Crassostrea*

gasar cultured in the northeast and south of Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, p. 172-184, 2017.

NASCIMENTO, I.A. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 35, p. 871-876, 1983.

OIE - World Animal Health Organization (Office International des Èpizooties). Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. OIE, Paris, 2006. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_glossaire.htm>. Acessado em: 03 jun. 2017.

PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis - Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 159-163, 2006.

PEREIRA, O.M.; HENRIQUES, M.B.; MACHADO, I.C. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananeia, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 19-28, 2003.

RIOS, E.C. **Compendium of Brazilian Sea Shells**. Rio Grande, Porto Alegre, 2009.

VILLALBA, A.; GESTAL, C.; CASAS, S.M.; FIGUERAS, A. **Perkinsosis en moluscos**. In: Figueras, A., Novoa, B. (Eds.), Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p. 181-242, 2011.

Capítulo 1
REVISÃO DE LITERATURA

Produção de bivalves no Brasil

O cultivo de organismos aquáticos (Aquicultura) é uma atividade sustentável, pois, além de aumentar a oferta de proteínas para as populações humanas, contribui para a preservação dos estoques naturais de moluscos, peixes e crustáceos na medida em que reduz o extrativismo desses recursos (BUYS, 2007).

A produção mundial de pescados via aquicultura, incluindo moluscos e outros organismos aquáticos no mundo, cresceu em média 8,6% ao ano em 22 anos, passando de 32,4 para 66,6 milhões de toneladas/ano. O Brasil atualmente ocupa a 12ª posição na produção mundial, havendo perspectivas, segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação = FAO) (FAO, 2016) de figurar entre os cinco maiores produtores nesse setor até 2020, o que se deve, segundo essa organização, a investimentos para melhorar a qualidade dos animais cultivados.

A malacocultura (cultivo de moluscos) se concentra mundialmente em um pequeno grupo de espécies de moluscos bivalves, que incluem pectinídeos, ostreídeos, mitilídeos e venerídeos (LAUCKNER, 1983), o que também ocorre no Brasil (BOEHS et al., 2012), onde as espécies de maior interesse econômico são os mariscos *Perna perna* (Linnaeus, 1758), *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) e *Mytella falcata* (Orbigny, 1846), a lambreta *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) (Lucinidae), o moapem *Tagelus plebeius* (Lightfoot, 1786), o maçunim ou berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791), a vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) e as ostras *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795), a ostra-do-Pacífico, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), a ostra-do-mangue e *C. gasar* (*C. brasiliana*), a ostra de fundo (LEGAT et al., 2017). Recentemente, no estado de Santa Catarina está sendo cultivada experimentalmente também *Pteria hirundo* (Linnaeus, 1758) (Pteriidae). Exceto *C. gigas*, todas as outras espécies mencionadas são nativas do território brasileiro.

O Brasil possui mais de 8.000 km de faixa litorânea, 12% das reservas de água doce do planeta, mais de dois milhões de hectares de manguezais e grande potencial para os diversos tipos de cultivo (FAO, 2012). O estado da Bahia

apresenta um extenso litoral, de cerca de 1.100 km, o maior dentre os estados brasileiros e ao longo de sua costa encontram-se diversos estuários, distribuídos ao longo de 40 bacias hidrográficas, cujo encontro de águas continentais e marinhas, gera riquezas inestimáveis (TELES; SAITO, 2009).

Ostras do gênero Crassostrea no Brasil

O Phylum Mollusca é o segundo maior grupo em número de espécies (cerca de 100 mil espécies) do Reino Animalia, sendo a Classe Bivalvia a de maior expressão econômica dentro do filo (BOEHS et al., 2012). Essa classe engloba organismos comumente sésseis e cosmopolitas, sendo grande parte das espécies euritérmica, suportando variações de temperatura entre 5 e 30°C, mas com faixa ótima de temperatura entre 21 e 28°C (NEHRING, 2006). Os bivalves são fisiologicamente sensíveis à poluição orgânica e química, à eutrofização e à colmatação, porém, resistentes a tais impactos devido à sua habilidade de adaptação ecológica (FERREIRA; MAGALHÃES, 2002; NEHRING, 2006).

Ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 possuem valvas relativamente finas, com a concha direita maior e escavada e a esquerda encaixada nesta e nas proximidades da margem dorsal das valvas. Observa-se a cicatriz muscular desenvolvida pela existência do músculo adutor (RIOS, 2009). Como os demais bivalves, são filtradoras, alimentando-se principalmente de fitoplâncton, bem como de bactérias, protozoários e de larvas de outros invertebrados presentes no plâncton, além de partículas orgânicas presentes em suspensão (FERREIRA; MAGALHÃES, 2002; NEHRING, 2006). As partículas rejeitadas como alimento podem refluir para a parte posterior direita das brânquias e então são eliminadas na forma de pseudofeces (GALTSOFF, 1964).

As ostras desse gênero são hermafroditas sequenciais protândricas, que dispersam seus gametas diretamente na água, sem incubação prévia, ocorrendo fertilização e ontogênese na coluna d'água, condição que dura de duas a quatro semanas, seguido pela fixação em substrato consolidado, onde os juvenis pelágicos planctotróficos realizam metamorfose (GALTSOFF, 1964; VILLARROEL et al., 2004; NEHRING, 2006). Segundo Nehring (2006), órgãos

específicos conferem às larvas capacidade livre natante e a dispersão destas pode ser realizada de forma ativa através da natação, embora ocorra de forma passiva a favor da corrente. A maturidade sexual dessas ostras é alcançada com aproximadamente 30 mm de altura (LENZ; BOEHS, 2011).

Na costa brasileira são encontradas duas espécies de ostras nativas desse gênero: *C. rhizophorae* e *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) e a exótica *C. gigas*, cultivada no estado de Santa Catarina. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), comumente denominada de ostra-do-mangue (Figuras 1A e 1B), ocorre desde o sul do Caribe até a costa do Uruguai, estando presente em toda a costa brasileira (RIOS, 2009). Essa espécie fixa-se sobre substratos consolidados, incluindo rochas, mas seu hábitat preferencial é sobre as raízes do mangue vermelho *Rhizophora mangle* L. (NASCIMENTO, 1983), planta halófito que ocupa a região entremarés (RIOS, 2009). Assim como as demais espécies desse gênero, *C. rhizophorae* é hermafrodita sequencial protândrica e ovulípara (com fertilização externa em meio aquático), cujas larvas fixam-se sobre o substrato após aproximadamente duas semanas, ocasião em que sofrem metamorfose (ALVES; MAGALHÃES, 2010; LENZ; BOEHS, 2011). Em estágio adulto, a concha atinge tamanho médio de altura de 6,5 cm, com formato variável e tonalidade que varia de clara a escura (LAZOSKI et al., 2011).

Crassostrea gasar (Lamarck, 1819) (= *C. brasiliiana*) (Figuras 2A e 2B), denominada muitas vezes de “ostra de fundo” (LEGAT et al., 2017) é também comumente encontrada sobre substratos consolidados ou nas raízes do mangue em regiões mais rasteiras, isto é, em níveis de maré mais baixos ou no sublitoral. Apresenta tamanho maior em relação a *C. rhizophorae*, crescendo até 19 cm de altura de concha (LAZOSKI et al., 2011) e também melhor desempenho (crescimento) quando cultivada em relação à esta (PEREIRA et al., 2003). Conforme Nascimento (1991), a cicatriz muscular em *C. gasar* apresenta-se geralmente em tom azul ou castanho, enquanto que em *C. rhizophorae*, esta é geralmente não pigmentada.



Figura 1. Valvas de *Crassostrea rhizophorae*, sendo: à esquerda: valva direita, vista externa e à direita, valva esquerda, vista interna.

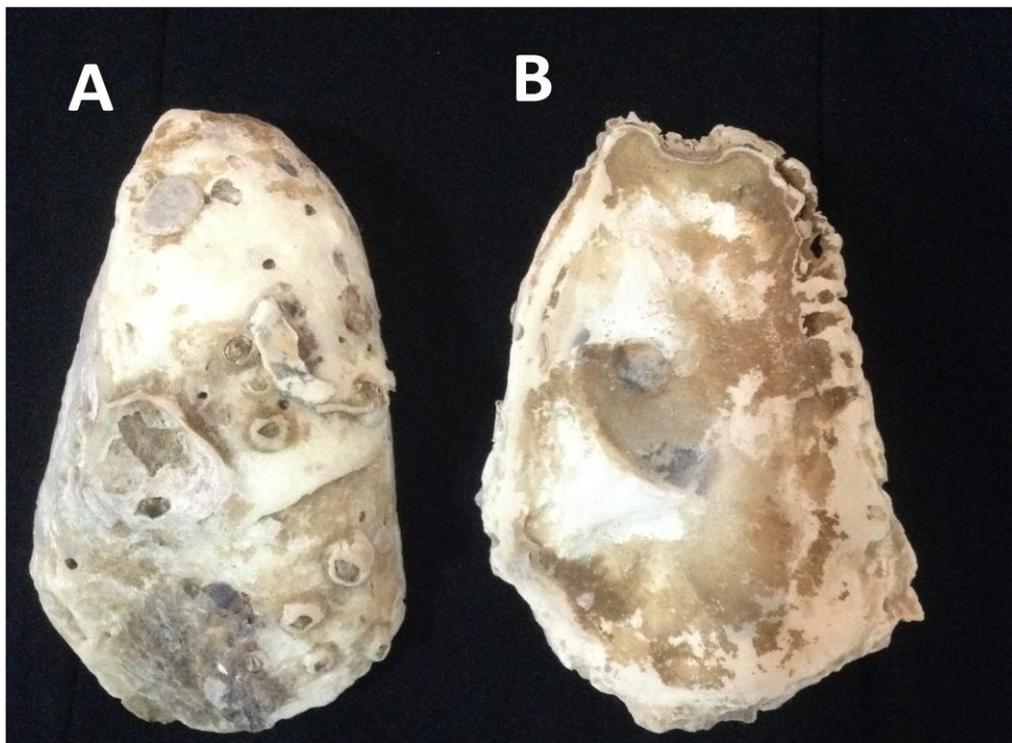


Figura 2. Valvas de *Crassostrea gasar* (= *C. brasiliana*), sendo: à esquerda: valva direita, vista externa e à direita, valva esquerda, vista interna.

Até meados da década de 1970, baseado apenas em características morfológicas, *C. rhizophorae* e *C. gasar* eram consideradas a mesma espécie. Entretanto, segundo Ignácio et al. (2000), características externas não são confiáveis em termos de identificação dessas espécies, visto que apresentam alta plasticidade da concha, isto é, a morfologia desta varia de acordo com as condições ambientais e isso pode dificultar a identificação, sendo mais indicado, para esse fim, o uso de análises moleculares como ferramentas confirmatórias.

A identificação genética de ostras do gênero *Crassostrea* tem sido realizada com *primer* 16S rDNA e posterior digestão com enzimas de restrição, principalmente *Hae III* (PIE et al., 2006). As enzimas de restrição são responsáveis por “cortar” regiões específicas do DNA, por isso também são denominadas de “tesouras inteligentes”. A diferenciação das espécies permite a construção de bancos de dados que possibilitem o estudo evolutivo e ecológico, bem como o manejo adequado para o uso com sucesso em cultivos com fins de alimentação e comercial (ALMEIDA et al., 2014).

Parasitismo

As ostras, assim como os demais bivalves, possuem hábito filtrador como modo de alimentação. Na ostra *C. rhizophorae*, por exemplo, cerca de cinco litros de água são filtrados por hora, podendo ocorrer a retenção de 75% das bactérias presentes no ambiente (BARROS et al., 2005), bem como a ingestão de partículas em suspensão, que podem conter estes ou outros microrganismos patogênicos (PEREIRA et al., 2006).

O parasitismo pode levar o bivalve a um estado de enfermidade (doença), que segundo Kinne (1983), pode ser definida como um desvio negativo, funcional e/ou estrutural, do estado normal, de saúde de um organismo, ocasionando a redução do seu potencial ecológico em termos de sobrevivência, crescimento, obtenção de energia, resistência ao estresse, capacidade de competição e reprodução. A doença pode causar, também, alterações imunológicas e fisiológicas (MORLEY, 2010). De acordo com Bower et al. (1994), as doenças em moluscos bivalves de interesse econômico podem causar

recorrentes mortalidades e conseqüentemente perdas na produção, representando um fator limitante para o cultivo e a comercialização desses organismos.

Segundo revisão de Boehs et al. (2012), para a costa brasileira, os patógenos já registrados em bivalves marinhos são pertencentes aos seguintes grupos de seres vivos: bactérias, fungos, protozoários (Apicomplexa, Ciliophora, Microspora e Perkinsozoa) e metazoários (Cestoda, Copepoda, Pinnotheridae, Polychaeta, Trematoda Digenea e Turbellaria).

Patógenos de moluscos de notificação obrigatória

Atualmente, a Organização Internacional de Epizootias (OIE) considera, em nível mundial, sete espécies de parasitos de declaração obrigatória para os moluscos bivalves: Herpesvírus, *Xenohalictis californiensis*, *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa*, *Marteilia refringens*, *Perkinsus marinus* e *Perkinsus olseni*, sendo os cinco últimos protozoários (OIE, 2011). Dos patógenos supracitados, os protozoários são os de maior gravidade para os moluscos, ocasionando prejuízos significativos aos cultivos, bem como às populações naturais (GUENN, 2006; MORLEY, 2010).

O protozoário Perkinsus

O gênero *Perkinsus* Levine, 1978 engloba espécies responsáveis por mortalidades em massa em moluscos bivalves em diversas partes do mundo (VILLALBA et al., 2011), incluindo ostras, vieiras, mexilhões e outros bivalves de interesse econômico cultivados, inclusive no Brasil (SABRY et al., 2009; BRANDÃO et al., 2013; DA SILVA et al., 2013; QUEIROGA et al., 2013; SABRY et al., 2013; FERREIRA et al., 2015; LUZ; BOEHS, 2016; PINTO et al., 2016; DA CUNHA, 2016). Além dos bivalves, esse patógeno pode também afetar algumas espécies de gastrópodes (PETTY, 2010).

1 - Histórico e aspectos de taxonomia

Em 1940 no Golfo do México e na Louisiana, costa atlântica dos Estados Unidos, eventos de mortalidade frequente começaram a ser observados em populações de ostras. Por vários anos, as perdas e o comprometimento sanitário desses animais foi atribuído à poluição por óleo, fato recorrente nessas áreas naquela época (MACKIN et al., 1950; LAUCKNER, 1983). Com as perdas econômicas, foram feitas pesquisas mais aprofundadas, que levaram a descoberta e descrição de *Perkinsus*, sendo este inicialmente classificado como um fungo e denominado de *Dermocystidium marinum* (MACKIN et al., 1950). Em decorrência, a enfermidade recebeu o nome de “Dermo”, termo ainda utilizado por alguns pesquisadores.

A posição taxonômica desse protozoário sofreu diversas mudanças nas décadas seguintes, sendo que em 1978, *Perkinsus marinus* foi estabelecido na classe Perkinsea (LEVINE, 1978) no filo Apicomplexa, baseado na descoberta da presença de uma estrutura conóide apical (PERKINS, 1976), também presente nos demais integrantes do grupo Apicomplexa. Porém, após estudos morfológicos e moleculares, observou-se que esse protozoário também possui características dos dinoflagelados, tendo sido constatado ser este mais próximo geneticamente deste grupo (FONG et al., 1993; GOGGIN; BARKER, 1993).

Norén et al. (1999) então sugeriram a criação do filo Perkinsozoa para agrupar, além de *Perkinsus*, outros alveolados (grupo que inclui dinoflagelados, ciliados e apicomplexos) com caracteres tanto dos apicomplexos quanto dos dinoflagelados (VILLALBA et al., 2011). Já Cavalier-Smith e Chao (2004) propuseram agrupar os apicomplexos e os dinoflagelados junto com outros protozoários muito próximos evolutivamente no filo Myzozoa, de forma que, nessa classificação, *Perkinsus* estaria muito próximo evolutivamente aos dinoflagelados. De acordo com essa classificação, o gênero *Perkinsus* ficaria incluído na Ordem Perkinsida, Classe Perkinsea, Infraphylum Protalveolata, Subfilo Dinozoa, Filo Myzozoa.

2 - Espécies descritas

Sete espécies são conhecidas até o momento, sendo elas:

- *Perkinsus marinus* (MACKIN et al., 1950)
- *Perkinsus olseni* (= *P. atlanticus*) (LESTER e DAVIS, 1981)
- *Perkinsus qugwadi* (BLACKBOURN et al., 1998)
- *Perkinsus chesapeakei* (= *P. andrewsi*) (MCLAUGHLIN et al., 2000)
- *Perkinsus mediterraneus* (CASAS et al., 2004)
- *Perkinsus honshuensis* (DUNGAN; REECE, 2006)
- *Perkinsus beihaiensis* (MOSS et al., 2008)

Concordando com Abollo et al. (2006), para os dois casos de sinonímia, conforme o *International Code of Zoological Nomenclature* (Código Internacional de Nomenclatura Zoológica), tem prioridade o nome mais antigo, no caso, *P. olseni* (sobre *P. atlanticus*) e *P. chesapeakei* (sobre *P. andrewsi*). Conforme já mencionado anteriormente, *P. olseni* e *P. marinus* são de notificação obrigatória a OIE.

2.1 - *Perkinsus olseni*

Infecções por essa espécie foram relatadas pela primeira vez no gastrópode abalons *Haliotis ruber* Leach, 1814 (LESTER; DAVIS, 1981) na Austrália, onde esse patógeno foi associado a mortalidades nesses moluscos. Posteriormente, essa espécie foi registrada em outras espécies e locais, como em *Ruditapes decussatus* em Portugal (AZEVEDO, 1989), em *R. philippinarum* (Adams e Reeve, 1850) na Coreia do Sul (CHOI; PARK, 2010), em *Pitar rostrata* (Koch, 1844) no Uruguai (CREMONTE et al., 2005), em *Protothaca jodoensis* (Lischke, 1874) na Coreia do Sul (PARK et al., 2006), em *Austrovenus stuchburyi* (W. Wood, 1828) na Nova Zelândia (DUNGAN et al., 2007), em *Tridacna crocea* Lamarck, 1819 no Vietnã (SHEPPARD; PHILLIPS, 2008) e em *R. decussatus* no Mediterrâneo espanhol (ELANDALOUSSI et al., 2009). Em ostras, foi registrada em *Crassostrea hongkongensis* Lam e Morton, 2003 e em

C. ariakensis no Sul da China (MOSS et al., 2007). Os trofozoítos (uma de suas formas parasitárias) de *P. olsenii* apresentam diâmetro de 13-16 µm (LESTER; DAVIS, 1981).

Perkinsus olsenii representa a espécie do gênero de maior distribuição geográfica e incidência em hospedeiros (VILLALBA et al., 2004, 2011). Essa espécie está associada a alta mortalidade de ostras e outros bivalves no Hemisfério Norte (VILLALBA et al., 2011).

2.2 - *Perkinsus marinus*

Perkinsus marinus tem sido associado à alta mortalidade de ostras, principalmente durante o verão e por isso é considerado de alta patogenicidade quando em temperaturas e salinidades adequadas para a sua proliferação (VILLALBA et al., 2011).

Essa espécie já foi relatada na Baía de Delaware, Chesapeake, costa atlântica do Estado de Louisiana nos Estados Unidos e no Golfo do México (BOWER et al., 1994; VILLALBA et al., 2004) na ostra americana *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) assim como em *C. gigas*, a ostra japonesa (ENRÍQUEZ-ESPINOZA et al., 2010). No México, *P. marinus* foi registrada na ostra nativa *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) (CÁCERES-MARTÍNEZ et al., 2008) e na ostra *Saccostrea palmula* (Carpenter, 1875) (CÁCERES-MARTÍNEZ et al., 2012). Além das ostras, este também já foi encontrado no bivalve *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758) na Flórida, Estados Unidos (MCCOY, 2005).

Nos últimos anos, *P. marinus* continua causando efeito devastador nas populações de ostras do Atlântico Norte e no Golfo do México. Como medida de controle, outras espécies de ostras foram introduzidas nessas baías para substituir *C. virginica*, como *C. ariakensis*, proveniente da China (MOSS et al., 2008). Essa última ostra foi escolhida por apresentar melhor crescimento, mais resistência a este protozoário, assim como a outros parasitos como *Haplosporidium nelsoni*. Por isso tem sido vista como nova opção para resolver as perdas sofridas (MOSS et al., 2008).

2.3 - *Perkinsus chesapeaki*

Perkinsus chesapeaki foi registrada pela primeira vez em *Mya arenaria* (Myidae) (MCLAUGHLIN et al., 2000) e posteriormente na ostra *Crassostrea virginica* (BURRESON et al., 2005; IFREMER, 2009), ambos os registros nos Estados Unidos. Mais recentemente, foi observada em *Cerastoderma edule* na costa Mediterrânea da Espanha (CARRASCO et al., 2014), em *Ruditapes philippinarum* na costa Galícia na Espanha (RAMILO et al., 2016) e em *C. rhizophorae* na costa do Nordeste do Brasil (DANTAS-NETO et al., 2016). Há pouca informação sobre as características morfológicas dessa espécie.

2.4 - *Perkinsus mediterraneus*

Essa espécie foi observada na ostra *Ostrea edulis* na Espanha (CASAS et al., 2004) e mais recentemente nos bivalves *Arca noae*, *Mimachlamys varia* e *Chamelea gallinana*, também na Espanha (VALENCIA et al., 2014), em *Ostrea edulis* na Itália e na Espanha (RAMILO et al., 2015) e em *Venus verrucosa* na Espanha (RAMILO et al., 2015).

2.5 - *Perkinsus honshuensis*

Encontrada no Japão infectando *Ruditapes philippinarum* (DUNGAN; REECE, 2006) e mais recentemente foi observada em *R. variegatus* na Coreia do Sul (KANG et al., 2016).

2.6 - *Perkinsus qugwadi*

Foi registrada infectando apenas a vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* no Canadá (BLACKBOURN et al., 1998). A validade dessa espécie dentro do gênero tem sido questionada e muito discutida, pois não é possível detectá-la através do método de cultivo Meio Fluído de Tioglicolato de Ray (RFTM) e também via região ITS (espaçador interno transcrito) do DNA comum entre as outras espécies (CASAS et al., 2002). Até o momento, só se tem registro dessa espécie na região de British Columbia, no Canadá, e acredita-se que esse isolamento a tenha tornado geneticamente diferente das demais espécies

conhecidas (FERNÁNDEZ; PÉREZ, 2008), tornando-se inviável a detecção através de RFTM e do *primer* para o gênero.

2.7 - *Perkinsus beihaiensis*

É a espécie mais nova do gênero e foi registrada por Moss et al. (2008) nas ostras *Crassostrea hongkongensis* e *C. ariakensis* no Sul da China, nas províncias de Fujian e Guangxi, Sanil et al. (2012) relataram essa espécie em *C. madrasensis* da Índia. No Brasil, essa espécie foi observada no Estado do Ceará, na região de Fortaleza, na ostra *C. rhizophorae* por Sabry et al. (2013) e em *Anomalocardia brasiliana* (FERREIRA et al., 2015) também nesse local, e em *C. rhizophorae* (LUZ; BOEHS, 2016; LUZ et al., 2017) e em *C. gasar* (= *C. brasiliana*) na Bahia (LUZ et al., 2017).

Perkinsus na América do Sul e no Brasil

Das sete espécies do gênero *Perkinsus*, quatro foram observadas no Brasil (*P. marinus*, *P. olseni*, *P. beihaiensis* e *P. chesapeakei*), sendo duas de declaração obrigatória (*P. marinus* e *P. olseni*). O resumo da ocorrência das espécies está apresentado na tabela 1.

Perkinsus olseni

A primeira observação de uma espécie de *Perkinsus* na América do Sul foi realizada, via análises moleculares, por Cremonte et al. (2005) no Uruguai, no venerídeo *Pitar rostrata*. Essa espécie foi observada posteriormente na Paraíba por Da Silva et al. (2014), infectando um exemplar da ostra nativa *C. gasar* (= *brasiliana*) também infectada por *P. marinus*.

Perkinsus marinus

O primeiro relato dessa espécie para a América do Sul foi realizado por Da Silva et al. (2013) no estado da Paraíba, com prevalências acima de 80%, sem menção de ocorrência de mortalidade. Recentemente, essa espécie foi observada na costa sul do estado da Bahia em populações naturais de *C. rhizophorae* na

região de Camamu (PINTO et al., 2016), no estado do Ceará (DANTAS-NETO et al., 2016), assim como no sul do Brasil, em Santa Catarina, no município de São Francisco do Sul nas ostras *C. gigas* e *C. gasar* (DA CUNHA, 2016). O registro mais recente dessa espécie foi realizado em Sergipe nas ostras *C. gasar* e *C. rhizophorae* (SCARDUA et al., 2017).

Perkinsus beihaiensis

No Brasil, o primeiro registro de *Perkinsus* sp. foi realizado no estado do Ceará por Sabry et al. (2009) no Rio Pacoti, em Fortaleza, em populações naturais de *C. rhizophorae*. Não foi observada mortalidade relacionada à ocorrência do protozoário. Em um estudo posterior, Sabry et al. (2013) identificaram, via técnica molecular, o referido protozoário, tratando-se de *P. beihaiensis*, que até então só havia sido observada no litoral sul da China (MOSS et al., 2008).

No litoral sul da Bahia, Brandão et al. (2013) observaram *Perkinsus* sp. em prevalência acima de 50% em ostras *Crassostrea rhizophorae*, sem observação de mortalidade. Posteriormente, Luz e Boehs (2016), em um estudo com populações naturais e cultivadas de ostras *Crassostrea* spp., constataram que nessa região há a ocorrência de *P. beihaiensis*.

Perkinsus beihaiensis também foi registrada no berbigão *Anomalocardia brasiliiana* em dois estuários no estado do Ceará, em populações naturais desse bivalve (FERREIRA et al., 2015).

Os mais recentes registros dessa espécie ocorreram em Balneário Barra do Sul, Santa Catarina, na ostra *Crassostrea gasar* (DA CUNHA, 2016) e em *C. gasar* e *C. rhizophorae* em Sergipe (SCARDUA et al., 2017).

Perkinsus chesapeaki

Essa espécie foi relatada no Estado do Ceará por Dantas-Neto et al. (2016) na ostra *C. rhizophorae*, tendo sido o primeiro registro desta na América do Sul.

Tabela 1. Espécies de *Perkinsus* relatados para a América do Sul.

Espécie	Hospedeiro	Local	Referência Bibliográfica
<i>Perkinsus marinus</i>	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Paraíba	Da Silva et al., 2013
	<i>Crassostrea gasar</i>	Sergipe	Da Silva et al., 2014
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Bahia	Pinto et al., 2016
	<i>Crassostrea gasar</i>	Paraíba	Queiroga et al., 2015
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ceará	Dantas-Neto, 2015
	<i>Crassostrea gigas</i> e <i>C. gasar</i>	Santa Catarina	Da Cunha, 2016
	<i>Crassostrea gasar</i> e <i>C. rhizophorae</i>	Sergipe	Scardua et al., 2017
<i>Perkinsus olseni</i>	<i>Pitar rostrata</i>	Uruguai	Cremonte et al., 2005
	<i>Crassostrea gasar</i>	Sergipe	Da Silva et al., 2014
	<i>Crassostrea gasar</i>	Paraíba	Queiroga et al., 2015
<i>Perkinsus chesapeaki</i>	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ceará	Dantas-Neto et al., 2016
<i>Perkinsus beihaiensis</i>	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ceará	Sabry et al., 2013
	<i>Anomalocardia brasiliiana</i>	Ceará	Ferreira et al., 2015
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Bahia	Luz e Boehs, 2016
	<i>Crassostrea gasar</i>	Paraíba	Queiroga et al., 2015
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Maranhão	Dantas-Neto, 2015
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Piauí	Dantas-Neto, 2015
	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Ceará	Dantas-Neto, 2015
	<i>Crassostrea gasar</i>	Santa Catarina	Da Cunha, 2016
	<i>Crassostrea gasar</i> e <i>C. rhizophorae</i>	Sergipe	Scardua et al., 2017

Transmissão de Perkinsus spp.

A transmissão de *Perkinsus* spp. é horizontal (entre indivíduos) e sem hospedeiros intermediários, sendo que o patógeno apresenta duas fases: a de vida livre e a parasitária. A transmissão por proximidade entre indivíduos é a forma mais frequente de transmissão e foi comprovado através de experimento realizado por Lauckner (1983), no qual ostras saudáveis e ostras doentes foram colocadas juntas, resultando em 95% de infecção, assim como em mortalidade de 50% nas ostras ora saudáveis. Nesse estudo, o autor comprovou também que ao se depositar fragmentos de ostras infectadas junto a ostras saudáveis, estas foram contaminadas em um percentual de 87%, atestando que o patógeno pode também ser transmitido via alimento, no momento que o patógeno passa dos fragmentos para a água do local, sendo esta filtrada pelas ostras saudáveis, com aquisição do patógeno. Em um estudo experimental realizado por Park et al. (2010) com *R. philippinarum*, na Coreia, foi possível isolar e identificar *P. olseni* nas fezes dos animais, comprovando que esta também é outra maneira de transmissão do protozoário.

Ciclo de Vida

Todo o ciclo de vida de *Perkinsus* é infeccioso, sendo caracterizado por três fases: **trofozoíto**, **hipnósporo** e **zoósporo** (CHOI; PARK, 2010; VILLALBA et al., 2011) (Figura 3).

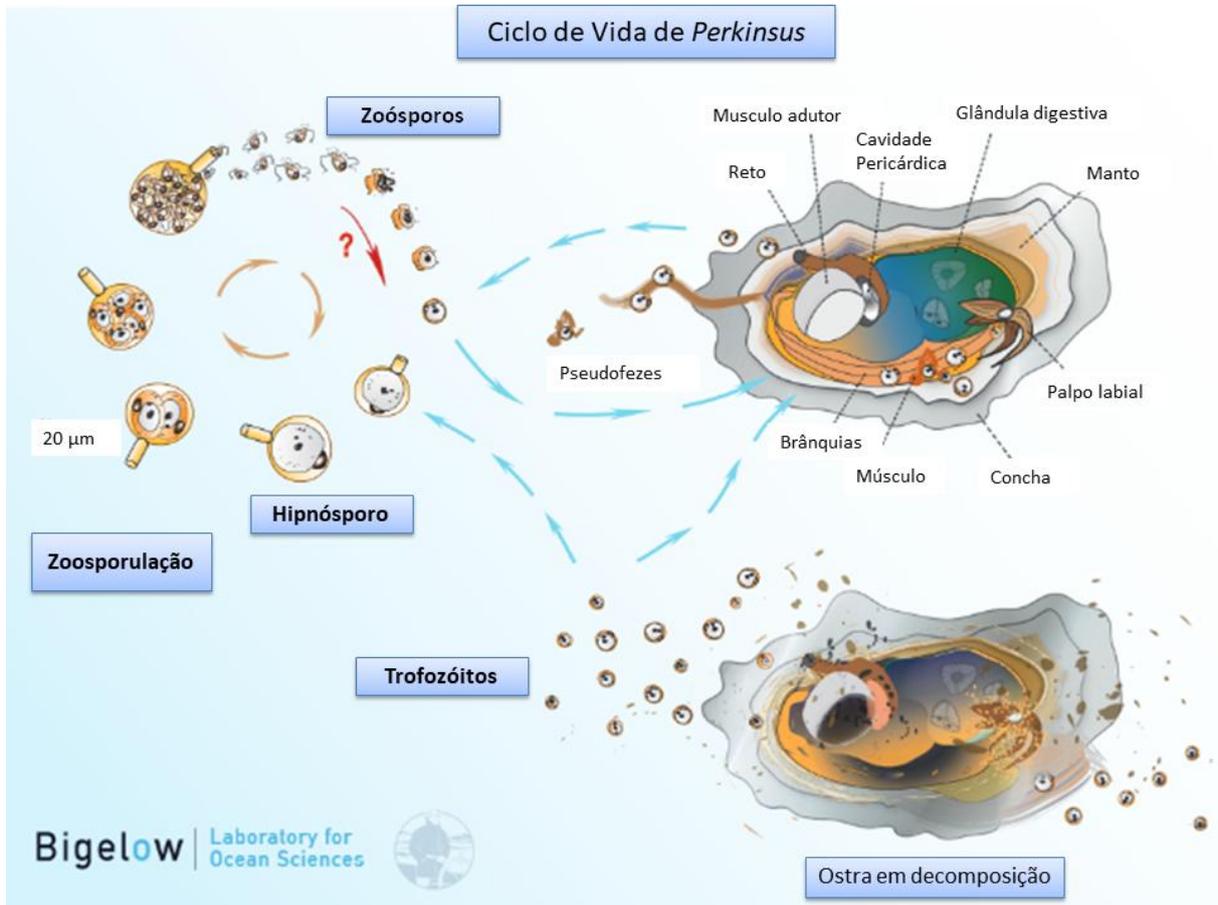


Figura 3. Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* na ostra *Crassostrea virginica*. Fonte: Fernández-Robledo (2015), editado.

O trofozoíto é uma célula esférica com vacúolo ocupando grande parte do volume celular, ocorrendo, geralmente, no tecido conjuntivo e epitelial do hospedeiro (Figura 4A e 4B). Após o seu amadurecimento, os trofozoítos entram em sucessivas divisões por bipartição, alternando entre cariocinese e citocinese para formar de 4 a 64 células, que ficam envoltas por uma parede, estágio a que se denomina de **roseta**, **esporângio** ou **esquizonte**. Com o rompimento da parede, ocorre a liberação dos trofozoítos imaturos (aplanósporos), que medem de 2 a 4 μm , que posteriormente terão o seu vacúolo ocupado, assim como na célula progenitora, dando início novamente a essa fase do ciclo (CASAS et al., 2002; CHOI; PARK, 2010; VILLALBA et al., 2011).

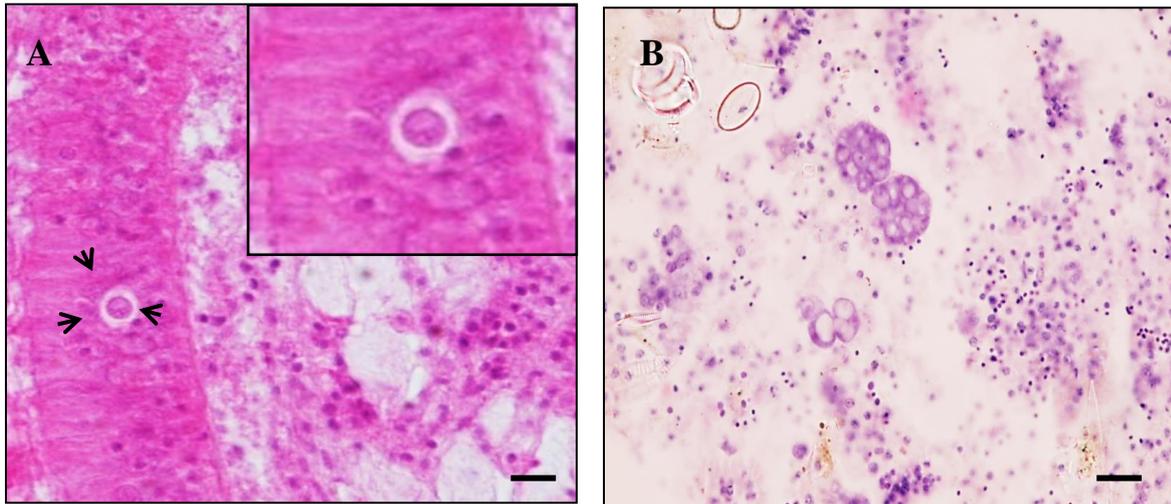


Figura 4. *Perkinsus beihaiensis* na ostra *Crassostrea rhizophorae*, mostrando em A trofozoíto e em B rosetas, indicados, respectivamente, por setas, Barras = 10 µm. Fonte: Luz, 2014.

A fase de hipnósporo, também chamada de prezoósporo, pode ser observada quando tecidos infectados são incubados em RFTM. Nessa fase, o parasito apresenta-se com formato esférico e parede espessa (Figura 5).

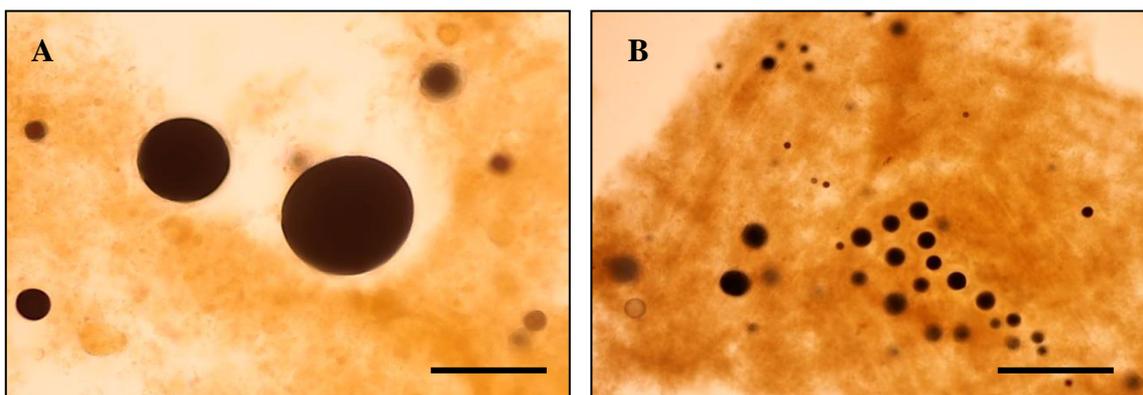


Figura 5. Hipnósporo de *Perkinsus beihaiensis* na ostra *Crassostrea rhizophorae* em aumentos de 40x e 10x (figuras A e B, respectivamente). Barras: 25 µm, respectivamente. Fonte: Luz, 2014.

Em meio experimental ou em ambiente natural, quando os hipnósporos estão em água salina com temperatura adequada (acima de 20°C), inicia-se a esporulação. Nessa fase ocorrem sucessivas divisões, formando vários zoósporos envolvidos por parede celular. Como resultado das inúmeras cariocineses e citocineses, ocorre a

liberação dos zoósporos através de uma estrutura chamada de tubo de descarga. Os zoósporos, que são biflagelados e possuem forma elipsoidal, são liberados, iniciando novamente o ciclo do protozoário (CASAS et al., 2002, 2004). Todos os aspectos morfológicos mencionados estão ilustrados na figura 6.

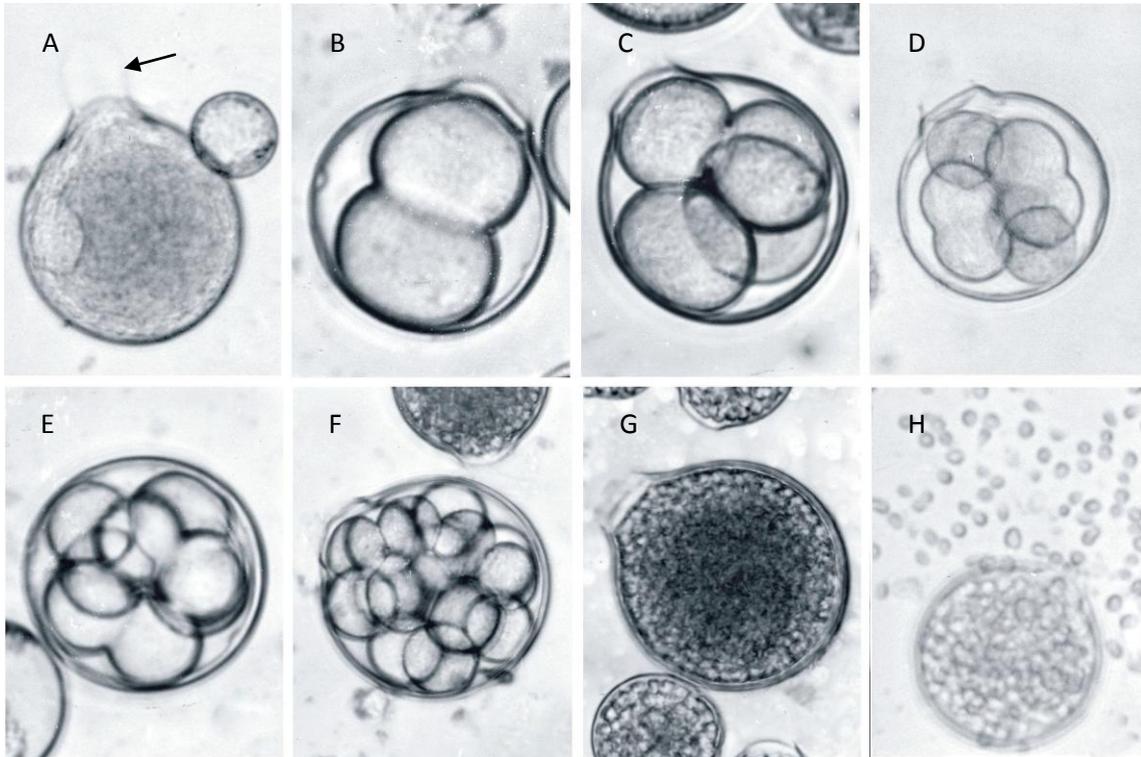


Figura 6. Processo de zoosporulação (fase Zoosporângio) de *Perkinsus olseni*. A. Zoosporângio unicelular mostra o tubo de descarga (seta); B. com 2 células; C. com 4 células; D. em divisão, correspondente à transição entre 4 e 8 células; E. com 8 células; F. com 16 células; G. com zoósporos móveis; H. Liberação dos zoósporos. Fonte: Villalba et al., 2011, editado.

Sintomas e patogenia da Perkinsiose

A Perkinsiose na ostra americana *Crassostrea virginica* causada por *P. marinus* causa grave emagrecimento, abertura involuntária das valvas (*gaping*), aparência pálida da glândula digestiva, encolhimento considerável dos tecidos, músculo adutor emacorado, encolhimento do manto e inibição no desenvolvimento das gônadas, com consequente redução da capacidade reprodutiva do indivíduo (MARTÍNEZ; YEOMANS, 2001; VILLALBA et al., 2004, 2011).

A presença de pústulas esbranquiçadas é frequente na superfície das brânquias ou manto de animais altamente infectados por *P. marinus* e *P. olsenii*, que correspondem a grandes bolsas de hemócitos em torno de acumulações dos parasitas (VILLALBA et al., 2011). Em infecções mais avançadas causadas por *P. olsenii*, foram observadas pústulas nas brânquias de *Ruditapes decussatus* e de *R. philippinarum* (AZEVEDO, 1989). Na vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* infectada por *P. qugwadi*, observou-se pústulas com até 5 mm de cor branca (BOWER et al., 1998; BLACKBOURN et al., 1998). Em estudos realizados na Coreia, Choi e Park (2005), observaram o retardamento do desenvolvimento das gônadas de *R. philippinarum* e infiltração hemocitária em torno de áreas infectadas. Nos gastrópodes *Haliotis rubra* e *H. laevigata*, as pústulas podem chegar a mais de 8 mm de diâmetro, ocorrendo no pé e no manto, causando destruição do tecido conjuntivo e do tecido epitelial do tubo digestório (BOWER et al., 1994). Uma vez no tecido conjuntivo, o patógeno pode ser distribuído pela hemolinfa para todas as partes do corpo do animal (LAUCKNER, 1983).

As regiões anatômicas mais suscetíveis à infecção são: glândula digestiva, manto e brânquias. Após a invasão do parasito, a resposta inicial do hospedeiro consiste em uma tentativa de encapsulamento por várias camadas de hemócitos, mas, pelo aumento do número de células do *Perkinsus*, essa cápsula desaparece, causando a liberação dos patógeno (SOUDANT et al., 2013).

Aspectos epidemiológicos

1 - Influência dos fatores ambientais

Segundo alguns estudos (CHOI; PARK, 2010; La PEYRE et al., 2010; DANG et al., 2012), a temperatura e a salinidade são os principais fatores abióticos que regulam o potencial de infecção do protozoário, sendo que a maioria dos estudos relacionados a esses aspectos são referentes a *P. marinus*, em que a proliferação ocorre facilmente acima de 20°C. A ocorrência desse parasito em águas tropicais e subtropicais sugere que a temperatura pode ser um fator limitante para a sua existência em algumas faixas geográficas (BOWER, 2003). Assim, no Hemisfério Norte, a

incidência e a intensidade da infecção aumentam linearmente com a temperatura, onde são relatadas mortalidades mais altas durante os meses mais quentes e declínio no início de meses mais frios (VILLALBA et al., 2011). Segundo revisão de Villalba et al. (2011), a prevalência e a intensidade das infecções por *P. marinus* aumentam com o aumento da temperatura, de modo que em latitudes intermediárias com ciclos anuais de períodos frios e quentes há um padrão sazonal de variação de prevalência e intensidade da infecção, enquanto que em latitudes mais baixas, quente ao longo do ano, observou esse padrão sazonal na dinâmica da infecção. Por outro lado, a influência da temperatura determinou que fosse possível a dispersão de *P. marinus* em latitudes cada vez mais altas como consequência de uma tendência de aumento da temperatura média de inverno ligada ao aquecimento global (FORD; CHINTALA 2006; VILLALBA et al., 2011).

Quanto à salinidade, Ray (1954) e Dang et al. (2012) relataram que *P. marinus* requer salinidades entre 12 e 15 Unidades Práticas de Salinidade (UPS) para o seu desenvolvimento proliferativo em ostras. Conforme VILLALBA et al. (2011), salinidades inferiores a esses valores ou excessivamente altas inibem a atividade do patógeno, mas não erradicam o patógeno do seu hospedeiro. Segundo esses autores, quando esta aumenta, tanto a prevalência quanto a intensidade de infecção também aumentam e nos casos nos quais o parasito já havia se estabelecido em determinado ambiente, este persistia por três meses em salinidade 5‰ (VILLALBA et al., 2011).

2 - Influência de estresse e idade

Para *Perkinsus marinus*, foi observado que a ação antrópica na água, juntamente com a extração descontrolada (destruição de hábitat) acentua o progresso da infecção em ostras (CHU; HALE, 1994; ANDERSON et al., 1996). Para *P. olseni*, observou-se favorecimento da infecção em áreas nas quais há intensa atividade humana (LEITE et al., 2004). Em Portugal, mortalidades na população de *R. decussatus* foram atribuídas a três fatores: infecção por *P. olseni* (AZEVEDO, 1989), contaminação (BEBIANNI, 1995) e hipoxia (SOBRAL; WIDDOWS, 1997). Acredita-se que as ações desses eventos juntos contribuem de forma sinérgica para a mortalidade do hospedeiro.

Para *P. marinus* infectando ostras e outros bivalves observou-se que a prevalência varia, também, de acordo com a idade dos hospedeiros. Indivíduos adultos são mais susceptíveis à infecção imediatamente após a desova, pois há um grande investimento energético previamente dispendido para os eventos da reprodução, ao passo que para indivíduos no primeiro ano de vida, as taxas são mais baixas (LAUCKNER, 1983; La PEYRE et al., 2010; CASAS; VILLALBA, 2012). Acredita-se que isso esteja intimamente relacionado à taxa de filtração realizada pelos animais, que proporcionalmente aumenta com o seu crescimento (RAY, 1954).

A associação entre a prevalência e a intensidade da infecção por *P. olseni* e a idade do molusco *R. decussatus* de bancos naturais também foi observada, de modo que o parasito não foi detectado em indivíduos com menos de um ano, enquanto que todos os animais com 3 anos estavam infectados (VILLALBA et al., 2005).

Métodos Diagnósticos

A Perkinsiose, doença causada por *Perkinsus* spp., pode ser detectada em alguns casos macroscopicamente, como observado na vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* infectada por *Perkinsus qugwadi* (BOWER et al., 1998; BLACKBOURN et al., 1998). Porém, na maioria das vezes, a doença é imperceptível macroscopicamente. Em função disso, foram desenvolvidas ferramentas diagnósticas, que a OIE (2017) recomenda que sejam utilizadas de modo conjugado e que são: (a) cultivo em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), (b) Histologia e (c) técnicas moleculares, sendo: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e sequenciamento de DNA.

1 - Meio Fluido de Tioglicolato de Ray - RFTM

Esse método foi desenvolvido por Ray (1952) e consiste em cultivar *in vitro* o protozoário *Perkinsus* através de tecidos infectados pelo parasito. Nessa técnica, é possível visualizar a fase de hipnósporo, com aumento de 40-50 µm de diâmetro, sendo que este apresenta parede espessa de natureza polissacarídica, que quando

corada com lugol, apresenta cor desde o castanho claro ao azul escuro e preto (VILLALBA et al., 2011).

A especificidade desse método é restrito em nível de gênero, sendo, portanto, um método presuntivo. O RFTM, por ser de baixo custo e com alta sensibilidade, é amplamente utilizado, tendo ainda a vantagem de permitir quantificar a intensidade da infecção (BRANDÃO, 2011).

O tipo de órgão utilizado para incubação no RFTM é variável, a depender da espécie hospedeira em investigação. No caso das ostras, geralmente são usados fragmentos do reto e das brânquias, enquanto que, no caso das amêijoas, geralmente são usadas somente as brânquias. Gauthier e Fisher (1990) adaptaram o método para incubar exclusivamente amostras de hemolinfa do molusco como um modo não letal para diagnosticar a Perkinsiose. Nickens et al. (2002) otimizaram esse protocolo, permitindo que um maior número de hipnósporos fosse coletado, reduzindo os resíduos de tecido e a viscosidade da amostra. Porém, a maior sensibilidade do método é alcançada quando todo o tecido do hospedeiro é incubado (BUSHEK et al., 1994; RODRÍGUEZ; NAVAS, 1995; VILLALBA et al., 2005).

A incubação é realizada por um período de 5 a 7 dias, à temperatura ambiente (24°C), em tubos fechados, com ausência de luz e ventilação (VILLALBA et al., 2011). Após esta, os tecidos são retirados dos tubos, colocados sobre lâmina, macerados e cortados com bisturi e depois cobertos com solução de Lugol (3%). A intensidade é calculada a partir de uma escala proposta por Mackin (em Ray, 1954), baseada na contagem de hipnósporos, com as seguintes categorias de intensidade de infecção: 0,5 (muito leve), 1 (leve), 2 (leve a moderada), 3 (moderada), 4 (moderada a grave) e 5 (grave).

2 - Histologia

A técnica histológica permite a visualização da fase de trofozoíto nos tecidos do hospedeiro em microscopia de luz (BRANDÃO et al., 2013; LUZ; BOEHS, 2016). Este método não possibilita a identificação da espécie.

3 - Métodos moleculares

A PCR possibilita a detecção do DNA do parasito e não o patógeno viável, ou seja, causando o desenvolvimento da doença (BRANDÃO, 2011). Casas et al. (2002) propuseram o par de *primers* PerkITS-85F (5'CCGCTTTGTTTGGATCCC) PerkITS-750R (5'ACATCAGGCCTTCTAATGATG 3'), que anelam especificamente em regiões conservadas dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e 2) e a região 5.8S do complexo de genes do ácido ribonucléico ribossômico (rRNA), exclusivos para os membros do gênero *Perkinsus* (exceto para *P. qugwadi*). A reação produz *amplicons* de 700pb. Posteriormente, outros iniciadores foram desenhados com a finalidade de identificar de forma específica a espécie.

Outro método complementar é o uso de enzimas de restrição (PCR-RFLP), que dependendo das endonucleases utilizadas, os padrões de restrição são diferentes entre *P. marinus* e *P. chesapeaki* (KOTOB et al., 1999) e entre eles, *P. olseni* e *P. mediterraneus* (ABOLLO et al., 2006).

O sequenciamento também tem sido uma técnica bastante difundida como um método confirmatório, para casos nos quais há *primers* ou quando não há iniciadores para a identificação. As sequências encontradas podem ser comparadas com outras depositadas no banco de dados GenBank (<http://ncbi.nih.gov>) e com essas informações é possível realizar análises filogenéticas que comprovem, através da história evolutiva, a origem e a confirmação da espécie estudada.

Nematopsis Schneider, 1892

Nematopsis é um protozoário do filo Apicomplexa, caracterizado por possuir um oocisto formado por uma parede espessa que envolve um único esporozoíto, sendo que os oocistos ocorrem dentro de um fagócito, que passa a mover-se dentro do tecido para a maioria dos órgãos do molusco (LAUCKNER, 1983). O número de oocistos por hemócito é variável, podendo variar de um a 20, mas na maioria das vezes, esse número é de um a três oocistos/fagócito (BOEHS et al., 2010). Os locais mais frequentes de infecção em moluscos bivalves são as brânquias e o manto, mas são encontrados, também, em outros locais como na glândula digestiva, palpos labiais, gônadas e no pé (BOEHS et al., 2012).

A identificação das espécies do *Nematopsis* sp. é feita através da forma, do tamanho e espessura da parede dos oocistos, assim como da morfologia do *operculum*, sendo a maioria descrita com base em microscopia eletrônica de varredura ou transmissão (MAGALHÃES et al., 2006).

O protozoário utiliza moluscos bivalves como hospedeiros intermediários e completa seu ciclo de vida no trato intestinal de crustáceos (LAUCKNER, 1983). O ciclo de vida, com as descrições das respectivas fases, está representado na Figura 7.

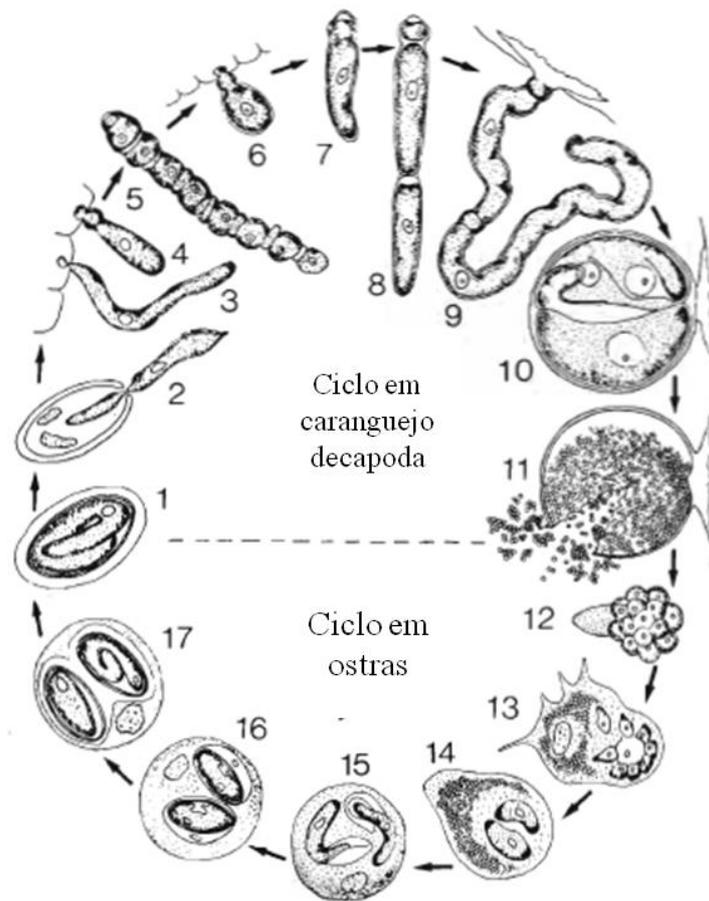


Figura 7. Ciclo de vida de *Nematopsis ostrearum* na ostra *Crassostrea virginica*. 1: Oocisto contendo um único esporozoítio; 2: Esporozoítio eclodindo de esporos no intestino de um caranguejo; 3: Adesão ao epitélio do intestino do hospedeiro; 4: Desenvolvimento em trofozoítio; 5: Associação de trofozoítos; 6: Reajuste temporário ao epitélio intestinal; 7: desenvolvimento em gamonte maduro; 8-9: Estágio seguido por fixação ao reto do caranguejo; 10: Formação de gametocistos; 11: Liberação de gimnósporos de ruptura do gametocisto; 12: gimnósporo único; 13: engolfamento de gimnósporos por fagócitos de ostras e interrupção desse estágio; 14-16: crescimento de esporozoítos dentro de fagócitos; 17: formação de oocistos resistentes dentro de fagócitos. Adaptado de Lauckner, 1983.

Protozoários patogênicos de veiculação hídrica e alimentar

Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*) (OMS, 2010), existe uma grande diversidade de patógenos para os humanos que podem estar sendo veiculados através do consumo da água e alimentos.

Protozoários, como os pertencentes aos gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia*, podem se alojar nos tecidos de ostras cultivadas em águas contaminadas por diversos resíduos (SOUZA, 2014). Esses patógenos entéricos são mais comuns em humanos e animais domésticos, mas também podem ser observados em hospedeiros silvestres (LEAL; FRANCO, 2008). Ambos os protozoários são transmitidos mediante a rota fecal-oral, após os estágios infectantes de *Cryptosporidium* e *Giardia* (oocistos e cistos, respectivamente) serem ingeridos por hospedeiros susceptíveis (LEAL; FRANCO, 2008).

A transmissão para os humanos ocorre por meio do contato direto de hospedeiro para hospedeiro, ou de maneira indireta, via água ou alimentos contaminados, superfícies contaminadas e mecanicamente por artrópodes e, já se evidenciou a transmissão de oocistos de *Cryptosporidium* por via aérea (FAYER et al., 2000; TZIPORI ; WARD, 2002; THOMPSON et al., 2004).

A criptosporidíase é causada pelo protozoário coccídeo *Cryptosporidium parvum*, que atinge as células epiteliais das vias gastrointestinais, biliares e respiratórias do homem, de diversos animais vertebrados e de grandes mamíferos. Essa doença não é considerada de notificação compulsória (BRASIL, 2010).

Já a giardíase é uma infecção por protozoários que atinge, principalmente, a porção superior do intestino delgado. Os agentes etiológicos são *Giardia lamblia* e *G. duodenalis*, protozoários flagelados que existem sob a forma de cisto e de trofozoíto. Assim como a criptosporidíase, essa também não é doença de notificação compulsória (BRASIL, 2010).

Outro protozoário patogênico transmitido via alimentação é a toxoplasmose, uma zoonose cosmopolita, responsável por determinar quadros variados, desde infecção assintomática a manifestações sistêmicas extremamente graves (BRASIL, 2010). *Toxoplasma gondii* é um agente etiológico intracelular, que possui como hospedeiros definitivos os gatos e outros felinos. Os hospedeiros intermediários são os

humanos, mamíferos não felinos e outros animais (HILL et al., 2005; BRASIL, 2010). Essa doença não é considerada de notificação compulsória.

Todas as três doenças supracitadas são consideradas zoonoses.

Oocistos e cistos de *Cryptosporidium* e de *Giardia* (LEAL et al., 2013), respectivamente, já foram relatados na ostra *Crassostrea rhizophorae* com potencial de infecção via alimentação (LEAL, 2008; LEAL;FRANCO, 2008). Para *Toxoplasma gondii*, não há relatos de contaminação via ingestão de bivalves, mas a detecção de DNA dessa espécie na ostra *C. rhizophorae* já foi relatada (RIBEIRO et al., 2015).

Quanto a protozoários do gênero *Perkinsus*, apesar de mortalidades relatadas nos seus hospedeiros moluscos e de sua descoberta na década de 1940, apenas um estudo em todo o mundo foi realizado com mamíferos, que consistiu em uma infecção experimental por via oral, com duração de sete dias de observação (WIJAYALATH et al., 2014). Nesse estudo, os animais não desenvolveram diarreia ou qualquer patologia detectável no trato gastrointestinal ou respiratório após alimentação única ou repetição com *P. marinus* vivos. Além disso, as populações de linfócitos no tecido linfoide associado ao intestino e no baço estavam inalteradas nos camundongos alimentados com o parasito, excluindo a possibilidade de inflamação local ou sistêmica. Esse estudo também demonstrou que mesmo sem causar lesão ou inflamação nos órgãos, há estímulo de respostas imunes específicas. Assim, foram observadas IgM (Imunoglobulina M) e IgG (Imunoglobulina G) pré-existentes e que o seu aumento foi bastante significativo. Entretanto, a IgA (Imunoglobulina A) não foi estimulada e portanto, não reativa ao parasita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOLLO, E.; CASAS, S.M.; CESCHIA, G.; VILLALBA, A. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. **Molecular and Cellular Probes**, v. 20, p. 323-329, 2006.
- ALMEIDA, D.D.; RIBEIRO, R.O.; ARAUJO, E.D.; FERREIRA, M.H.A.; LOPES, A.C.M. Identificação molecular de ostras *Crassostrea* spp. (Mollusca: Bivalvia) dos dois maiores estuários do estado de Sergipe por PCR/RFLP. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v. 2, p. 31-36, 2014.
- ALVES, R.; MAGALHÃES, A.R.M. Método para obtenção de metáfases mitóticas de ostras para o estudo do cariótipo. **Biotemas**, v. 23, p. 111-119, 2010.
- ANDERSON, R.S.; UNGER, M.A.; BURRESON, E.M. Enhancement of *Perkinsus marinus* disease progression in TBT-exposed oysters (*Crassostrea virginica*), **Marine Environmental Research** v. 42, p. 177-180, 1996.
- AZEVEDO, C. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of clams, *Ruditapes decussatus*, from Portugal. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 627-635, 1989.
- BARROS, L.M.O.; THEOPHILO, G.N.D.; COSTA, R.N.; RODRIGUES, D.P.; VIEIRA, R.H.S.F. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, p. 285-289, 2005.
- BEBIANNI, M.J. Effects of pollutants in the Ria Formosa Lagoon, Portugal. **Science of the Total Environment**, v. 171, p. 107-115, 1995.
- BLACKBOURN, J.; BOWER, S.M.; MEYER, G.R. *Perkinsus qugwadi* sp. nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 942-953, 1998.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, p. 865-869, 2004.

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O. Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M.L.A.; TAKEMOTO, R. (org.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos, Maringá, Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos**. 1º ed. Maringá: Massoni, Cap. 8. p. 165-193. 2012.

BOEHS, G; VILLALBA, A; CEUTA, L.O; LUZ, J.R. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 43-47, 2010.

BOWER, S.M.; BLACKBOURN, J.; MEYER, G.R. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. **Canadian Journal of Zoology**, v.76; p. 954-959, 1998.

BOWER, S.M.; McGLADDERY, S.E.; PRICE, I.M. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 1-199, 1994.

BOWER, S.M.; BURRESON, E.; REECE, K. **Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms**. Mariculture Committee, Conseil International pour l'Exploration de la Mer, 2003.

BRANDÃO, R.P. **Avaliação da saúde da ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* no Litoral Sul da Bahia, com ênfase no protozoário *Perkinsus***. 2011, f. 92, Dissertação (Mestrado em Sistemas Aquáticos Tropicais – Ecologia), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O.; LUZ, M.S.A.; QUEIROGA, F.R.; DA SILVA, P.M. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 138-141, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. –8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.444 p.

BURRESON, E.M.; REECE, K.S.; DUNGAN, C.F. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrews*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, p. 258-270, 2005.

BUSHEK, D.; FORD, S.E.; ALLEN, S.K. Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4, p. 201-217, 1994.

BUYS, B. Mar brasileiro é rico em diversidade de espécies, mas os estoques são escassos. **Inovação Uniemp**, v. 3, p. 12-15, 2007.

CÁCERES-MARTÍNEZ, J.; ORTEGA, M.G.; YEOMANS, R.V.; GARCÍA, T. J.P.; STOKES, N.A.; CARNEGIE, R.B. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 321-325, 2012.

CÁCERES-MARTÍNEZ, J.; VÁSQUEZ-YEOMANS, R.; PADILLA-LARDIZÁBAL, G.; DEL RÍO PORTILLA, M.A. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific Coast of México. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.99, p. 66-73, 2008.

CARRASCO, N.; ROJAS, M.; ACEITUNO, P.; ANDREE, K.B.; LACUESTA, B.; FURONES, M.D. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European

common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, p. 56-60, 2014.

CASAS, S.M.; VILLALBA, A. Study of perkinsosis in the grooved carpet shell clam *Ruditapes ecussatus* in Galicia (NW Spain). III. The effects of *Perkinsus olseni* infection on clam reproduction. **Aquaculture**, v. 356-357, p. 40-47, 2012.

CASAS, S.M.; GRAU, A.; REECE, K.S.; APAKUPAKUL, K.; AZEVEDO, C.; VILLALBA, A. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 58, p. 231-244, 2004.

CASAS, S.M.; VILLALBA, A.; REECE, K.S. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the a etiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity **Disease of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 51-65, 2002.

CAVALIER-SMITH, T.; CHAO, E.E. Protoalveolate phylogeny and systematics and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. nov.) **European Journal of Protistology**, v. 40, p. 185-212, 2004.

CHOI, K.; PARK, K. Current Status of *Perkinsus* Infection in Korean Waters. In: WALKER, P.; LESTER, R.; BONDAD-RENTASO, M.G. **Diseases in Asian Aquaculture** v, p. 263-274. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 2005.

CHOI, K.; PARK, K. Review on the Protozoan Parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) Infection in Asian Waters. **Coast Environmental Ecosystem Issues East China Sea**. p. 269-281, 2010.

CREMONTE, F.; BALSEIRO, P.; FIGUERAS, A.; Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar rostrata* from Uruguay, southwestern Atlantic coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, p. 85-90, 2005.

DA CUNHA, A.C.L.B. **Diagnóstico de *Perkinsus* em ostras no litoral catarinense**. 2016, f. 65. Dissertação de Mestrado Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

DA SILVA, P.M.; SCARDUA, M.P.; VIANNA, R.T.; MENDONÇA, R.C.; VIEIRA, C.B.; DUNGAN, C.F.; SCOTT, G.P.; REECE, K.S. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 119, p. 62–71, 2014.

DA SILVA, P.M.; VIANNA, R.T.; GUERTLER, C.; FERREIRA, L.P.; SANTANA, L.N.; FERNÁNDEZ-BOO, S.; RAMILO, A.; CAO, A.; VILLALBA, A. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil), **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 96-103, 2013.

DANG, V.T.; SPECK, P.; BENKENDORFF, K. Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, *Haliotis rubra*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, p. 732-740, 2012.

DANTAS NETO, M.P. **Patógenos na ostra *Crassostrea rhizophorae* de estuários da costa setentrional do Nordeste brasileiro**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 119 p., 2015.

DANTAS-NETO, M.; GESTEIRA, T.C.; SABRY, R.C.; FEIJÓ, R.G.; FORTE, J.M.; BOEHS, G.; MAGGIONI, R. First record of *Perkinsus chesapeaki* infecting *Crassostrea rhizophorae* in South America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 141, p. 53-56, 2016.

DANTAS-NETO, M.P.; SABRY, R.C.; FERREIRA, L.P.; ROMÃO, L.S.; MAGGIONI, R. *Perkinsus* sp. infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* from estuaries of the septentrional Northeast, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** (Online), v. 75, p. 1030-1034, 2015.

DUNGAN, C.F.; REECE, K.S.; MOSS, J.A.; HAMILTON, R.M.; DIGGLES, B.K. *Perkinsus olseni* in vitro Isolates from the New Zealand Clam *Austrovenus stutchburyi*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, p. 263–270, 2007.

DUNGAN, C.F.; REECE, K.S. In Vitro Propagation of Two *Perkinsus* spp. Parasites from Japanese Manila Clams *Venerupis philippinarum* and Description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 316-326, 2006.

ELANDALOUSSI, L.M.; CARRASCO, N.; ROQUE, A.; ANDREE, K.; FURONES, M.D. First record of *Perkinsus olseni*, a protozoan parasite infecting the commercial clam *Ruditapes decussatus* in Spanish Mediterranean waters. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 50-53, 2009.

ENRÍQUEZ-ESPINOZA, T.L.; GRIJALVA-CHON, J.M.; CASTRO-LONGORIA, R.; RAMOS-PAREDES, J. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 89, p. 269-273, 2010.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection, and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1305-1322, 2000.

FERNÁNDEZ, R.; PÉREZ, M. Perkinsosis and clam industry in Europe. In: VILLALBA, A. **Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry**, Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR, Vigo, Espanha, 2008.

FERREIRA, J.F.; MAGALHÃES, A.R.M. **Cultivo de mexilhões**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, p. 1-33, 2002.

FERREIRA, L.P.; SABRY, R.C.; DA SILVA, P.M.; GESTEIRA, T.C.V.; ROMÃO, L.S.; PAZ, M.P.; FEIJÓ, R.G.; DANTAS-NETO, M.P.; MAGGIONI, R. First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 67-70, 2015.

FONG, D.; RODRÍGUEZ, R.; KOO, K.; SUN, J.; SOGIN, M.L.; BUSHEK, D.; LITTLEWOOD, D.T; FORD, S.E. Small subunit ribosomal RNA gene sequence of the oyster parasite *Perkinsus marinus*. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 2, p. 346-350, 1993.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma. 224 p. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Investing in Agriculture for a better future**. Roma. 182p. 2012.

FORD, S.E.; CHINTALA, M.M. Northward expansion of a marine parasite: Testing the role of cold adaptation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 339, p. 226-235, 2006.

GALTSOFF, P.S. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Washington, D.C., Government Printing Office, **Fish and Wildlife Service Bulletin**, v. 64, p. 480, 1964.

GAUTHIER, J.D.; FISHER, W.S. Hemolymph assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* in oysters *Crassostrea virginica*. **Journal of Shellfish Research** v. 9, p. 367-371, 1990.

GOGGIN, C.L.; BARKER, S.C. Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 65, p. 179-182, 1993.

GUENN, J. Etude et optimisation des cultures cellulaires de *Perkinsus olseni* parasite de la palourde. Institut Français de Recherche pour l' Exploitation de la Mer – IFREMER, **Département génie biologique, La Rochelle**, France, p. 47, 2006.

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**. v. 6, p. 41-61, 2005.

IFREMER – Institut Français de Recherche pour l' Exploitation de la Mer. **Diagnosis by histopathology of *Perkinsus* sp. in molluscs.** Community Reference, Laboratory for Molluscs Diseases, 1^a ed., 2009.

IGNÁCIO, B.L.; ABSHER, T.M.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A.M. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, v. 136, p. 987–991, 2000.

KANG, H.S.; YANG, H.S.; REECE, K.S.; HONG, H.K.; PARK, K.I.; CHOI, K.S. First report of *Perkinsus honshuensis* in the variegated carpet shell clam *Ruditapes variegatus* in Korea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, p. 35-41, 2016.

KINNE, O. **Diseases of marine animals.** Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland, v. 2, 1983.

KOTOB, S.I.; MCLAUGHLIN, S.M.; VAN BERKUM, P.; FAISAL, M. Characterization of two *Perkinsus* spp. from the softshell clam, *Mya arenaria* using the small subunit ribosomal RNA gene. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 439-444, 1999.

LA PEYRE, M.K.; CASAS, S.M.; GAYLE, W.; LA PEYRE, J. The combined influence of sub-optimal temperature and salinity on the in vitro viability of *Perkinsus marinus*, a protistan parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 176-181, 2010.

LAUCKNER, G. **Diseases of Mollusca: Bivalvia.** In: KINNE, O. (ed). Diseases of marine animals. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. v. 2, 1983.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLE-CAVA, A.M. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series** v. 426, p. 197-212, 2011.

LEAL, D.A.G.; RAMOS, A.P.D.; SOUZA, D.S.M.; DURIGAN, M.; GREINERT-GOULART, J.A.; MORESCO, V.; AMSTUTZ, R.C.; MICOLI, A.H.; NETO, R.C.;

BARARDI, C.R.M.; FRANCO, R.M.B. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an U.V based depuration system. **Ocean & Coastal Management**, v. 72, p. 93-100, 2013.

LEAL, D.A.G. **Avaliação da contaminação de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) por espécies de *Cryptosporidium* e *Giardia* em um ambiente de estuário do litoral de São Paulo**. 2008, f. 201. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas, São Paulo, 2008.

LEAL, D.A.G.; FRANCO, R.M.B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 10, p. 48-57, 2008.

LEGAT, J.F.A.; PUCHNICK-LEGAT, A.; FOGAÇA, F.H.S.; TURECK, C.R.; SUHNEL, S.; MELO, C.M.R. Growth and survival of bottom oyster *Crassostrea gasar* cultured in the northeast and south of Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, p. 172-184, 2017.

LEITE, R.B. AFONSO, R; CANCELA, M.L. *Perkinsus* sp. infestation in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (L), along the Portuguese coast. Results from a 2-year survey. **Aquaculture**, v. 240, p. 39-53, 2004.

LENZ, T.; BOEHS, G. Ciclo reproductivo del ostión de manglar *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) en la Bahía de Camamu, Bahia, Brasil. **Revista de Biología Tropical**, v. 59, p. 137-149, 2011.

LESTER, R.J.G.; DAVIS, G.H.G. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the Abalone *Haliotis ruber*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 37, p. 181-187, 1981.

LEVINE, N.D. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan Phylum Apicomplexa. **Journal for Parasitology**, v. 64, p. 549, 1978.

LUZ, M.S.A; CARVALHO, F.S.; OLIVEIRA, H.C.; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) in oysters of Bahia State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 2017. DOI: 10.1590/1519-6984.07016.

LUZ, M.S.A; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* under cultivation and in natural stock in Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 53, p. 191-198, 2016.

LUZ, M.S.A *Perkinsus* spp. (Perkinsozoa) e outros parasitos na ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) de estoques naturais e de cultivo da Baía de Camamu, Bahia. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Santa Cruz.

MACKIN, J.G.; OWEN, H.M.; COLLIER, A. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Science**, v. 111, p. 328-329, 1950.

MARTÍNEZ, J.C.; YEOMANS, R.V. **Manual de enfermedades de moluscos. Boletín Del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico**, v. 4, 2001.

McCOY, A.M. **Examination of *Mercenaria mercenaria* as a host for *Perkinsus marinus***. Flórida, EUA. 67p. Dissertação de Mestrado. Universidade da Flórida, 2005.

MCLAUGHLIN, S.M.; TALL, B.D.; SHAHEEN, A.; ELSAYED, E.E.; FAISAL, M. Zoosporulation of a new *Perkinsus* species isolated from the gills of the soft shell clam *Mya arenaria*. **Parasite**, v. 7, p. 115-122, 2000.

MORLEY, N.J. Interactive effects of infectious diseases and pollution in aquatic molluscs. **Aquatic Toxicology**, v. 96, p. 27-36, 2010.

MOSS, J.A.; XIAO, J.; DUNGAN, C.F.; REECE, K.S. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. Parasite in Oysters of Southern China. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 117-130, 2008.

MOSS, J.A.; BURRESON, E.M.; CORDES, J.F.; DUNGAN, C.F.; BROWN, G. D.; WANG, A.; WU, X.; REECE, K.S. Pathogens of *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 77, p. 207-223, 2007.

NASCIMENTO, I.A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck) in South and Central America. In: Estuarine and marine bivalve mollusk culture. (W. Menzel, ed.), p. 125 – 134. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991.

NASCIMENTO, I.A. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 35, p. 871-876, 1983.

NEHRING, S.N. **Invasive Alien Species Fact Sheet** *Crassostrea gigas*. Koblenz, Germany, 2006.

NICKENS, A.D.; LAPEYRE, J.F.; WAGNER, E.S.; TIERSCH, T.R. An improved procedure to count *Perkinsus marinus* in eastern oyster hemolymph. **Journal of Shellfish Research**, v. 21, p. 725-732, 2002.

NÓREN, F.; MOESTRUP, O.; REHNSTAM-HOLM, A.S. Parvillucifera infectans Nóren et Möestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. **European Journal of Protistology**, v. 35, p. 233-254, 1999.

OIE–World Animal Health Organization (Office International des Épizooties). Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. OIE, Paris, 2006. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_glossaire.htm>. Acessado em: 03 jun. 2017.

OIE–World Animal Health Organization (Office International des Épizooties). **Aquatic Animal Health Code**. 2011.

PARK, K.; YANG, H.S.; KANG, H.S.; CHO, M.; PARK, K.J.; CHOI, K.S. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using

immunological and molecular techniques. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 261-269, 2010.

PARK, K.; NGO, T.T.T.; CHOI, S.D.; CHO, M.; CHOI, K.S.A. Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 81-87, 2006.

PEREIRA, M.A; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis - Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 159-163, 2006.

PEREIRA, O.M.; HENRIQUES, M.B.; MACHADO, I.C. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananeia, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 19-28, 2003.

PERKINS, F.O. Zoospore of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. **Journal of Parasitology**, v. 62, p. 959-974, 1976.

PETTY, D. *Perkinsus Infections of Bivalve Molluscs*. University of Florida, 2010.

PIE, M.R.; RIBEIRO, R.O.; BOEGER, W.A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R.M.; ANGELO, L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research** v. 37, p. 1598-1600, 2006.

PINTO, T.R.; BOEHS, G.; PESSOA, W.F.B.; LUZ, M.S.A; COSTA, H. Detection of *Perkinsus marinus* in the oyster *Crassostrea rhizophorae* in southern Bahia by proteomic analysis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 53, p. 1-4, 2016.

QUEIROGA, F.R.; MARQUES-SANTOS, L.F. ; DE MEDEIROS, I.A.; DA SILVA, P. M. Effects of salinity and temperature on in vitro cell cycle and proliferation of *Perkinsus marinus* from Brazil. **Parasitology** (London. Print), v. 143, p. 475-487, 2016.

QUEIROGA, F. R.; VIANNA, R.T.; VIEIRA, C.B.; FARIAS, N.D.; DA SILVA, P.M. . Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. **Parasitology** (Cambridge. Online), v. 142, p. 756-766, 2015.

QUEIROGA, F.R.; MARQUES-SANTOS, L.F.; HÉGARET, H.; SOUDANT, P.; FARIAS, N.D.; SCHLINDWEIN, A.D.; DA SILVA, P.M. Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35 p. 319- 327, 2013.

RAMILO, A.; PINTADO, J.; VILLALBA, A.; ABOLLO, E. *Perkinsus olseni* and *P. chesapeakei* detected in a survey of Perkinsosis of various clam species in Galicia (NW Spain) using PCR–DGGE as a screening tool. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 133, p. 50-58, 2016.

RAMILO, A.; CARRASCO, N.; REECE, K.S; VALENCIA, J.M.; GRAU, A.; ACEITUNO, P.; ROJAS, M.; GAIRIN, I.; FURONES, M.D.; ABOLLO, E.; VILLALBA, A. Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp. (Protista) in new locations and hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 37-41, 2015.

RAY, S.M. Biological studies of *Dermocystidium marinum*. **Rice Institute Pamphlet.**, v. 41, p. 1-114, 1954.

RAY, S.M. A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owell and Collier in oysters. **Science**, v. 116, p. 360-361, 1952.

RIBEIRO, L.A.; SANTOS, L.K.N.S.S.; BRITO, J.R.P.A.; MACIEL, B.M.; DA SILVA, A.V.; ALBUQUERQUE, G.R. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in

Brazilian oysters (*Crassostrea rhizophorae*). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 4658-4665, 2015.

RIOS, E.C. **Compendium of Brazilian** Sea Shells. Rio Grande, Porto Alegre, 2009.

RODRÍGUEZ, F.; NAVAS, J.I.A. comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). **Aquaculture**, v. 132, p. 145-152, 1995.

SABRY, R.C., GESTEIRA, T.C.V.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A.; GUERTLER, C.; FERREIRA, L.P.; VIANNA, R.T.; DA SILVA, P.M. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti river estuary, Ceará state, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 24-32, 2013.

SABRY, R.C.; ROSA, R.D.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A.; GESTEIRA, T.C.V.; DA SILVA, P.M. First report of a *Perkinsus* sp. infecting Mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary - Ceará, Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 67, p. 755-758, 2009.

SANIL, N.K.; SUJA, G.; LIJO, J.; VIJAYAN, K.K. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, p. 209-220, 2012.

SCARDUA, M.P.; VIANNA, R.T.; DUARTE, S.S.; FARIAS, N.D.; CORREIA, M.L.D.; SANTOS, H.T.A.D.; DA SILVA, P.M. Growth, mortality and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. infection during on growing in northeast Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, 2017.

SHEPPARD, B.J.; PHILLIPS, A.C.; *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 79, p. 229-235, 2008.

SOBRAL, P.; WIDDOWS, J. Influence of hypoxia and anoxia on the physiological responses of the clam *Ruditapes decussatus* from southern Portugal. **Marine Biology**, v.127, p. 455-461, 1997.

SOUDANT, P.; CHU, F.L.E.; VOLETY, A. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. **Journal of Invertebrate pathology**, v. 114, p. 196-216, 2013.

SOUZA, D.S.M. **Aquisição e eliminação de contaminantes em tecidos de moluscos bivalves**, f. 159. Tese de Doutorado Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

TELES, L.J.S.; SAITO, C.H. Ballast water and sustainability: identification of areas for unballasting by geoprocessing – case study in Todos os Santos Bay, Brazil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, p. 283-293, 2009.

THOMPSON, R.C.A.; MONIS, P.T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 69-137, 2004.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis, and disease. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1047-1058, 2002.

VALENCIA, J.M.; BASSITTA, M.; PICORNELL, A.; RAMON, C.; CASTRO, J.A. New data on *Perkinsus mediterraneus* in the Balearic Archipelago: locations and affected species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 13, p. 69-82, 2014.

VILLALBA, A.; GESTAL, C.; CASAS, S.M.; FIGUERAS, A. **Perkinsosis en moluscos**. In: Figueras, A., Novoa, B. (Eds.), Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p. 181-242, 2011.

VILLALBA, A.; CASAS, S.M.; LÓPEZ, M.C.; CARBALLAL, M.J. Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 65, p. 257-267, 2005.

VILLALBA, A.; REECE, K. S.; ORDÁS, M.C.; CASAS, S. M.; FIGUERAS, A. Perkinsosis in molluscs: a review. **Aquatic Living Resources**, v. 17, p. 411-432, 2004.

VILLARROEL, E.; BUITRAGO, E.; LODEIROS, C. Identificación de factores ambientales que afectan al crecimiento y la supervivencia de *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca: Bivalvia) bajo condiciones de cultivo suspendido en el Golfo de Cariaco, Venezuela. **Revista Científica**, FCV-LUZ, v. 14, p. 28-35, 2004.

WIJAYALATH, W.; MAJJI, S.; KLESCHENKO, Y.; POW-SANG, L.; BRUMEANU, T.D.; VILLASANTE, E.F.; VASTA, G.R.; FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J.A.; CASARES, S. Humanized HLA-DR4 mice fed with the protozoan pathogen of oysters *Perkinsus marinus* (Dermo) do not develop noticeable pathology but elicit systemic immunity. **Plos One**. v. 9, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Safe Management of Shellfish and Harvest Waters. London, IWA Publishing: 360. 2010.

CAPÍTULO 2

OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* SACCO, 1897 NO ESTADO DA BAHIA, BRASIL

Artigo a ser submetido ao BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA (BIP)

ISSN 0046-9939 (impresso) e ISSN 1678-2305 (online)

Normas da revista: Anexo I

OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* SACCO, 1897 NO ESTADO DA BAHIA, BRASIL

Mariane dos Santos Aguiar LUZ, Verena Rebeca Dias ANDRADE, Guisla BOEHS*

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal; Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16; CEP: 45.662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil

*Autor para correspondência: gboehs@uesc.br

RESUMO

As ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 têm ampla distribuição mundial, sendo importantes recursos extrativistas e de cultivo na costa brasileira. Por apresentarem grande plasticidade morfológica, a identificação fenotípica das mesmas nem sempre é segura. O objetivo neste estudo foi identificar as espécies de ostras em estuários do litoral da Bahia. Para tal, foram feitas coletas em 12 estações amostrais (n = 320) entre as latitudes 12°39' e 15°42'S, em bancos naturais, estruturas artificiais e ambientes de cultivo. A identificação foi feita com uso das ferramentas moleculares PCR, PCR-RFLP, sequenciamento de DNA e análise filogenética. Exceto pelo tamanho, não foram observadas diferenças morfológicas entre as espécies. As análises genéticas evidenciaram a presença de duas espécies: *Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar* (= *C. brasiliiana*). A primeira está tipicamente fixa na parte aérea (raízes e troncos) de *Rhizophora mangle* L. e em outros substratos consolidados na região entremarés, ao passo que a segunda foi observada em níveis entremarés mais baixos e no sublitoral, evidenciando que as espécies tem habitat levemente distinto. Todas as ostras dos cultivos eram *C. gasar*.

Palavras-chave: bivalves; identificação genética; ostreicultura; recursos pesqueiros.

OYSTERS OF THE GENUS *Crassostrea* SACCO, 1897 IN STATE OF BAHIA, BRAZIL

ABSTRACT

Oysters of the genus *Crassostrea* Sacco, 1897 are widely distributed worldwide, being important extractive and cultivation resources in the Brazilian coast. Because they have great morphological plasticity, the phenotypic identification of them is not always safe. The objective of this study was to identify oyster species in estuaries of the coast of Bahia (NE-Brazil). For this purpose, samples were collected in 12 sample stations (n=320) between latitudes 12°39'-15°42'S, in natural stocks, artificial structures and cultivation environments. Identification was made using the molecular tools PCR, PCR-RFLP, DNA sequencing and phylogenetic analysis. Except for size, no morphological differences were observed between species. Genetic analysis revealed the presence of two species: *Crassostrea rhizophorae* and *C. gasar* (= *C. brasiliiana*). The first is typically fixed on the aerial part (roots and trunks) of *Rhizophora mangle* L. and other substrates consolidated in the intertidal region, while the second was observed at lower intertidal and sublittoral levels, showing that the species have slightly different habitats. All the oysters of the cultures were *C. gasar*.

Key words: bivalves; genetic identification; ostreiculture; resources.

INTRODUÇÃO

Ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia: Ostreidae) estão amplamente distribuídas em nível mundial, tendo relevante valor econômico, tanto como recurso extrativista quanto como em ostreicultura. Sua concha tem formato variável, sendo geralmente alongada, com valvas desiguais, sendo a valva superior (direita) menor e mais achatada e a inferior (esquerda) maior e côncava (escavada) (GALTSOFF, 1964; RIOS, 2009), pela qual ocorre a fixação no substrato consolidado (AMARAL e SIMONE, 2014). Esse gênero ainda se caracteriza pela presença de uma câmara promial, no lado direito do corpo, que inverte a movimentação da corrente exalante, que é considerada uma adaptação a locais com elevada turbidez (GALTSOFF, 1964), sendo um dos motivos de sua ampla ocorrência em manguezais.

No gênero *Crassostrea* estão descritas 21 espécies, sendo que outras 21 constam como sinônimas (BOUCHET e GOFAS, 2012). O principal motivo por não haver unanimidade a respeito da denominação das espécies é a alta plasticidade fenotípica dessas ostras (TACK *et al.*, 1992), o que também ocorre com as ostras desse gênero encontradas no Brasil (VARELA *et al.*, 2007). Contudo, as identificações se tornaram mais seguras nas últimas décadas com o advento do uso de marcadores moleculares.

Rios (2009), com base em análises morfológicas, aceita a existência de apenas uma espécie nativa na costa brasileira: *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). Segundo esse autor, *C. brasiliana* (Lamarck, 1819) estaria sinônima com esta. Porém, análises eletroforéticas apontaram, há aproximadamente duas décadas (ABSHER, 1989; IGNÁCIO *et al.*, 2000) para a existência de ambas as espécies no Brasil. Na última década, outros estudos moleculares indicaram *C. brasiliana* tratar-se, de fato, de *C. gasar* (PIE *et al.*, 2006; VARELA *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2010b; LAZOSKI *et al.*, 2011), uma espécie que também ocorre na costa da África.

Já num estudo sobre o gênero *Crassostrea* do Brasil e Caribe, utilizando análise morfo-anatômica e revisão taxonômica, AMARAL e SIMONE (2014) afirmam que as espécies brasileiras são *Crassostrea brasiliana*, com distribuição da Paraíba a Santa Catarina e *Crassostrea mangle* Amaral e Simone, 2014, com ocorrência do Pará a Santa Catarina, sendo que esta última, segundo os próprios autores, seria a espécie equivalente à conhecida *C. rhizophorae* do litoral brasileiro. Esses autores refutaram a existência de *C. gasar* (Dautzenberg, 1891) no Brasil e atestam que *C. rhizophorae* é de fato uma espécie que ocorre no Caribe. *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), a ostra do Pacífico, é também mencionada por esses autores como espécie exótica, sendo a espécie mais cultivada em Santa Catarina, sul do

Brasil (LEGAT *et al.*, 2017), onde esta já foi encontrada, também, em bancos naturais (MELO *et al.*, 2010b).

O litoral do estado da Bahia, com cerca de 1.100 km, caracteriza-se como uma faixa costeira com extensas praias, além de várias baías, com diferentes níveis de antropização, sendo as maiores a Baía de Todos os Santos, localizada em Salvador, seguida da Baía de Camamu, a cerca de 100 km desta, ao sul, abrangendo municípios como Camamu e Maraú. Ostras do gênero *Crassostrea* são recursos extrativistas locais de grande relevância, principalmente para as populações ribeirinhas, que as utilizam para consumo e exploração (LENZ e BOEHS, 2011). Além do extrativismo, em alguns locais do centro sul do estado, já existe a ostreicultura de pequena escala, seja em sistema de mesa ou em espinhel (*long line*), uma atividade predominantemente praticada por comunidades tradicionais, em sua maioria com o apoio de universidades estaduais e federais e de órgãos governamentais, como a Bahia Pesca. Porém, devido à grande semelhança fenotípica das ostras da região, não se sabe ao certo determinar as espécies, exceto por deduções empíricas de locais de sua ocorrência (habitat) ou pelo tamanho de indivíduos, parâmetros estes que nem sempre se mostram seguros. As sementes de ostras são localmente provenientes dos próprios cultivos, já que ainda não há uma larvicultura instalada na região.

Apesar da importância sócio-econômica das ostras na região, não há estudos envolvendo técnicas moleculares para a identificação das espécies, o que dificulta a obtenção e o uso de sementes para a ostreicultura local, que é um dos entraves à expansão da atividade no estado.

Neste estudo, objetivou-se fazer a identificação genética de ostras provenientes do litoral centro-sul do estado da Bahia, cuja informação poderá ter relevante aplicabilidade na ostreicultura regional, como por exemplo, em larvicultura, em estudos de associação de patógenos, assim como ao conhecimento da ecologia e conservação das espécies em seus bancos naturais.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de ostras foram feitas em 12 estações de amostragem (St1-St12) localizadas entre as latitudes 12°39'27,00"S e 15°42'41,41"S, sendo que a estação St1 esteve localizada em Salvador, as estações St2-St6 no município de Camamu, as estações St7-St8 no município de Maraú, as estações St9 e St10 em Ilhéus e as estações St11 e St12 em Canavieiras (**Figura 1**). As coletas foram feitas em 2014 (outubro a dezembro) e em 2015 (janeiro a março) e foram

autorizadas pelo Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Brasil (Licença número 20912-3; Anexo p. 148).

Os espécimens ($n = 320$) foram removidos dos troncos e raízes de *Rhizophorae mangle* L. ou das rochas e estruturas de concreto, com o auxílio de uma faca, sempre durante maré baixa. Nas estações St1, St7a and St8a também foram obtidos exemplares de cultivos, sendo que no primeiro local as ostras foram obtidas de cultivos em sistema mesa (tabuleiro) e nos outros dois locais em sistema espinhel (*long line*). Estas foram colocadas em baldes contendo uma pequena porção de água do mar de cada local e processadas no período de 6 horas após sua coleta. Os primeiros processamentos foram feitos no Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Estadual de Santa Cruz (LMM/UESC), onde as ostras foram medidas ao longo do seu maior eixo (altura = eixo dorso-ventral), de acordo com GALTSOFF (1964). As análises genéticas foram feitas no Laboratório de Genética Veterinária da UESC, complementadas em laboratório do sul do Brasil.

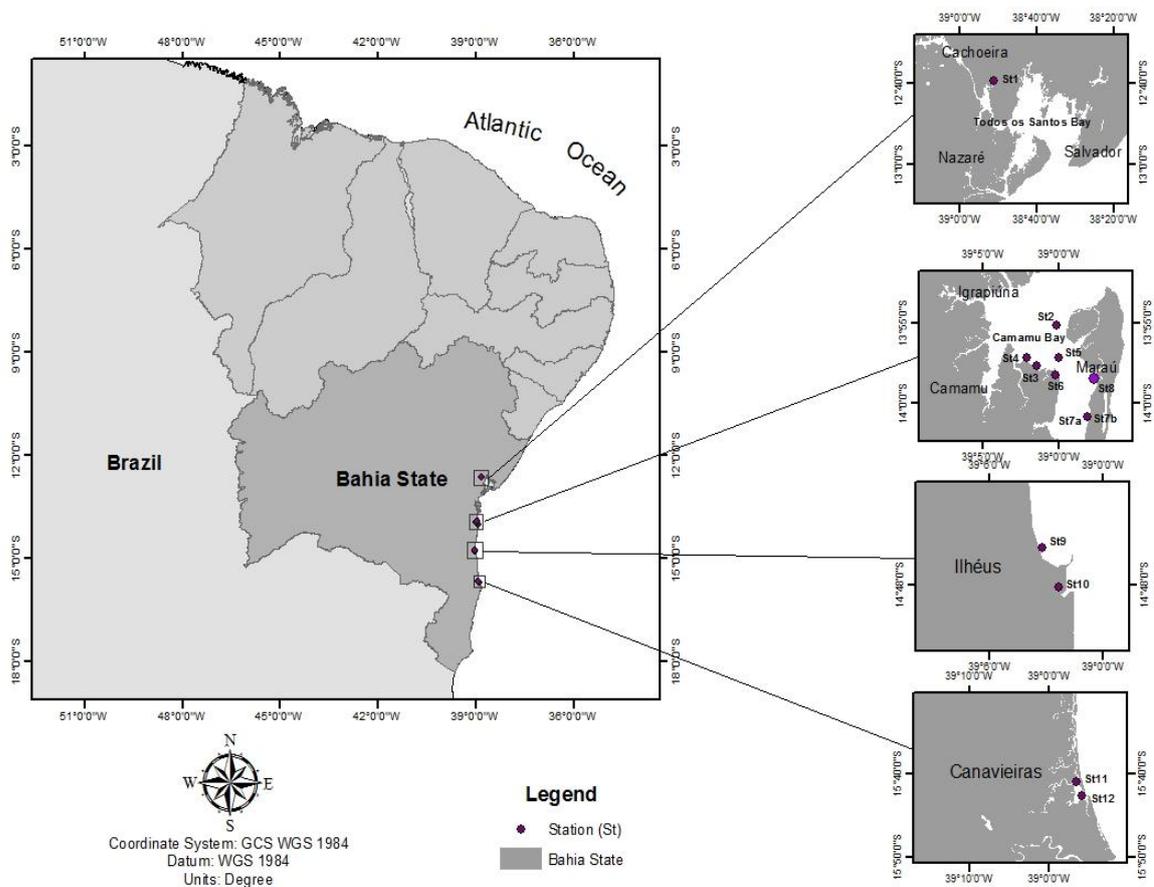


Figura 1. Mapa da área de estudo, indicando as estações de coleta (St1-St12).

Para as análises moleculares, foram utilizados fragmentos do músculo adutor de todos os exemplares (n = 320), que foram congelados e armazenados a -80°C até o seu processamento. A extração total de DNA foi feita usando o protocolo fenol-clorofórmio (OIE, 2012). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi feita com um total de 100-200 ng de DNA, 0.25 U de Taq Polymerase (*Invitrogen*®), 2.5 mM de dNTP, 10.0 pmol de cada *primer* e 2.5 mM de MgCl₂. Foi utilizado o 16S rDNA par de *primers* de 16S.AR (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e 16S.BR (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (PALUMBI *et al.*, 1991), com um total de 35 ciclos com temperatura de anelamento de 56°C por 40s, produzindo *amplicons* de 530 pares de bases (pb). A seguir, foi usada uma segunda técnica de biologia molecular, a PCR-RFLP - Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), em que o produto das reações de PCR foram digeridas com 10U endonuclease *HaeIII*, com volume final de 10 uL; as amostras foram incubadas por 1 h a 37°C e foram posteriormente observadas em gel de agarose a 2% corado com *Syber Safe*®, sendo esperados amplicons de 230pb para *C. gasar* e 260pb para *C. rhizophorae* (PIE *et al.*, 2006). O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre (RS), utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (50 ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do primer (16S.AR e 16S.BR) e 0,5 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 55°C por 5 seg e 60°C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático.

Os resultados foram comparados com a ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) com outros dados depositados no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Os dados da sequência de nucleotídeos para os haplotipos utilizados neste estudo serão depositados no GenBank.

Um representante de *Saccostrea cucullata* foi utilizado para verificar se este gênero é irmão ou derivado de *Crassostrea*. Uma espécie de *Ostrea* (*Ostrea edulis*) que pertence à mesma subfamília (Ostreinae) foi utilizada como grupo externo (outgroup). Os alinhamentos

de seqüências foram produzidos usando os programas BioEdit (HALL, 1999) e ClustalX. As frequências de nucleotídeos e a relação transição/trans-versão foram obtidas usando o software Mega 6.6 (TAMURA *et al.*, 2013), que também foi usado para as análises filogenéticas usando o método Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) e da Máxima Parsimônia (MP). As seqüências de outras espécies de *Crassostrea* foram obtidas do GenBank (**Tabela 1**). A análise envolveu 24 sequências de nucleotídeos. As posições de *codons* incluídas foram 1^a + 2^a + 3^a + não codificados. Todas as posições com menos de 100% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 0% de lacunas de alinhamento, dados perdidos e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Havia um total de 365 posições no conjunto de dados final.

Tabela 1. Informações sobre os números de acesso no GenBank utilizados para as análises filogenéticas deste estudo.

Espécie	Número de acesso	Referência	Local
<i>Crassostrea brasiliana</i>	DQ839413	PIE <i>et al.</i> , 2006	Sul do Brasil
<i>Crassostrea brasiliana</i>	FJ478027	MELO <i>et al.</i> , 2010a	Sul do Brasil
<i>Crassostrea brasiliana</i>	JN849099	GALVÃO <i>et al.</i> , 2013	Sudeste do Brasil
<i>Crassostrea brasiliana</i>	JN849103	GALVÃO <i>et al.</i> , 2013	Sudeste do Brasil
<i>Crassostrea brasiliana</i>	HQ711626	INTROINI <i>et al.</i> , 2012	Sudeste do Brasil
<i>Crassostrea gasar</i>	AJ312937	LAPÉGUE <i>et al.</i> , 2002	América do Sul, Atlântico
<i>Crassostrea gasar</i>	EF473270	VARELA <i>et al.</i> , 2007	Brasil*
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	AJ312938	LAPÉGUE <i>et al.</i> , 2002	América do Sul, Atlântico
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	FJ478030	MELO <i>et al.</i> , 2010a	Sul do Brasil
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	JN849107	GALVÃO <i>et al.</i> , 2013	Sudeste do Brasil
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	JN849104	GALVÃO <i>et al.</i> , 2013	Sudeste do Brasil
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	DQ839415	PIE <i>et al.</i> , 2006	Sul do Brasil
<i>Crassostrea gigas</i>	AF280611	YU <i>et al.</i> , 2000	China
<i>Crassostrea hongkongensis</i>	AY160756	LAM e MORTON, 2001	China
<i>Crassostrea angulata</i>	KC170322	WANG, 2012	China
<i>Crassostrea virginica</i>	KC429253	SHARMA <i>et al.</i> , 2013	EUA
<i>Crassostrea virginica</i>	AF092285	MCCARTHY <i>et al.</i> , 1998	EUA
<i>Crassostrea ariakensis</i>	AY160757	LAM e MORTON, 2002	China
<i>Crassostrea ariakensis</i>	FJ743506	JUNG <i>et al.</i> , 2009	Sul da Coreia
<i>Saccostrea cucullata</i>	AF458909	LAM e MORTON, 2001	Hong Kong e Austrália
<i>Ostrea edulis</i>	AF540597	LAM <i>et al.</i> , 2002	Austrália

*Santa Catarina, Espírito Santo, Alagoas, Pará, Piauí, Ceará, Maranhão, Tocantins

RESULTADOS

As análises moleculares confirmaram a existência de duas espécies de ostras no litoral da Bahia, identificadas como *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *C. gasar* (Deshayes, 1830). As similaridades com o banco de dados do NCBI para as sequências já depositadas foram de 98 a 100%. Os amplicons obtidos apresentaram o tamanho esperado, sendo que na PCR foram de 530 pares de bases (pb) (**Figura 2**) e na PCR-RFLP de 260 pb para *C. rhizophorae* e 230 pb para *C. gasar* (**Figura 3**). A análise filogenética, mostrada nas **figuras 4** (método de Neighbor-Joining) e **5** (Método da Parsimônia), evidencia que não há diferenciação genética entre *C. gasar* e *C. brasiliiana*.

Não foram observadas diferenças morfológicas entre as duas espécies, exceto que *C. gasar* apresentava tamanho geralmente maior e foi encontrada em níveis entremarés mais baixos e no infralitoral. As amostras de *C. rhizophorae* apresentaram altura média de $4,91 \pm 1,2$ cm (n = 236) e de *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) de $7,47 \pm 1,77$ cm (n = 84). As ostras dos cultivos, correspondentes às amostras das estações ST1 (Baía de Todos os Santos), St7 (Ilha de Tanques) e St8 (Maraú) foram todas identificadas como sendo *C. gasar* (**Table 2**).

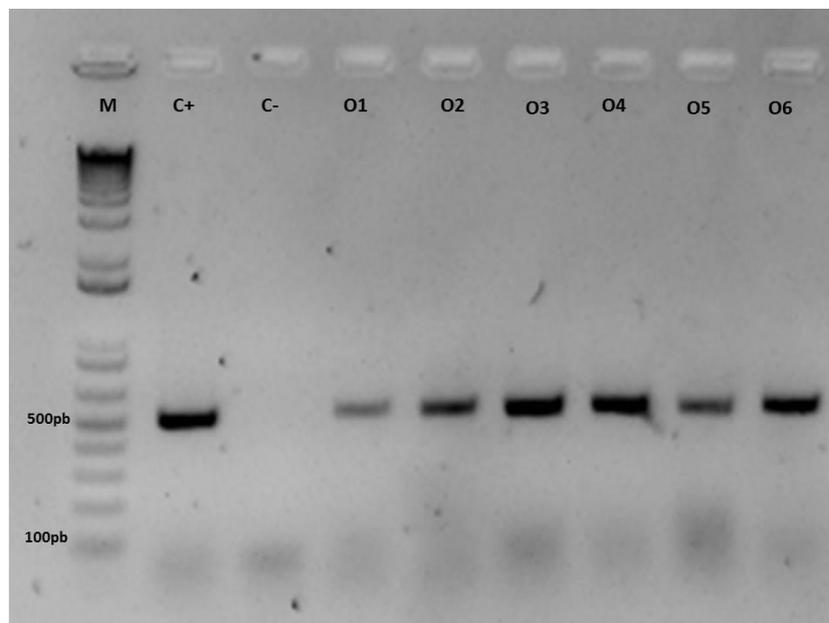


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose (2%) com amplificações de fragmentos de 530 bp, obtidos em PCR para a identificação das ostras. A primeira linha superior mostra o marcador molecular (M), seguido pelo controle positivo (C+), negativo (C-) e as amostras (1, 2, 3, 5, 6), todas positivas.

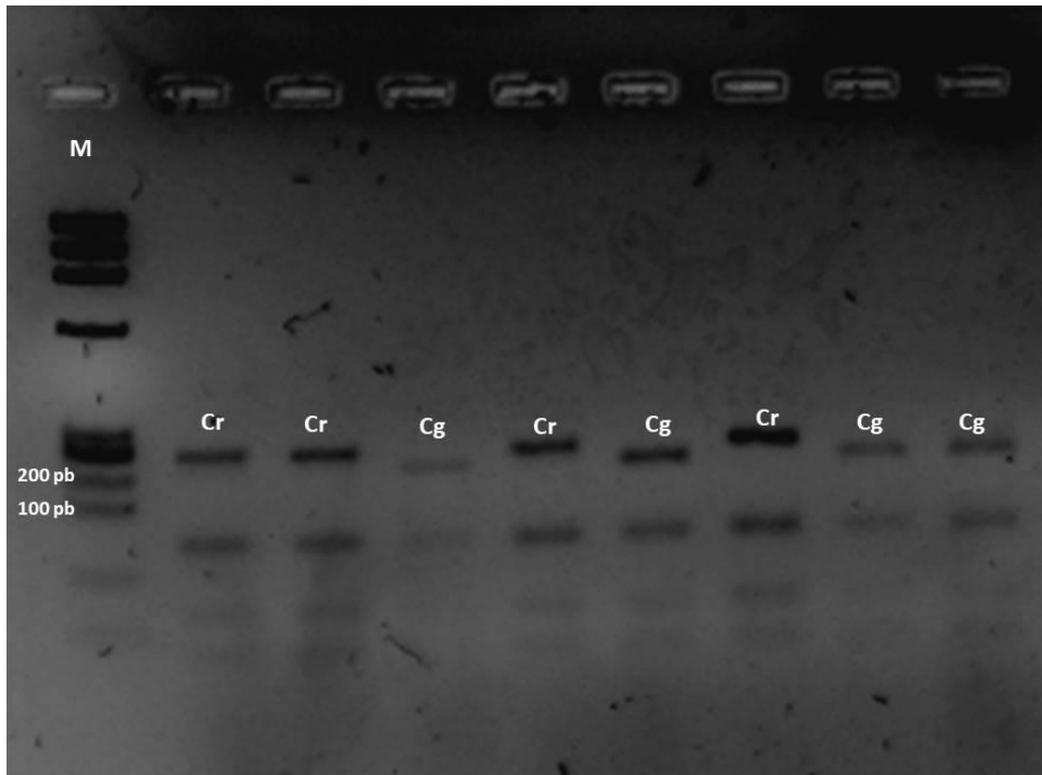


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (2%) com ampliações de fragmentos de 230 bp e 260 pb obtidos em PCR-RFLP para a identificação das ostras. M= Marcador molecular Cr = *Crassostrea rhizophorae*; Cg = *C. gasar*.

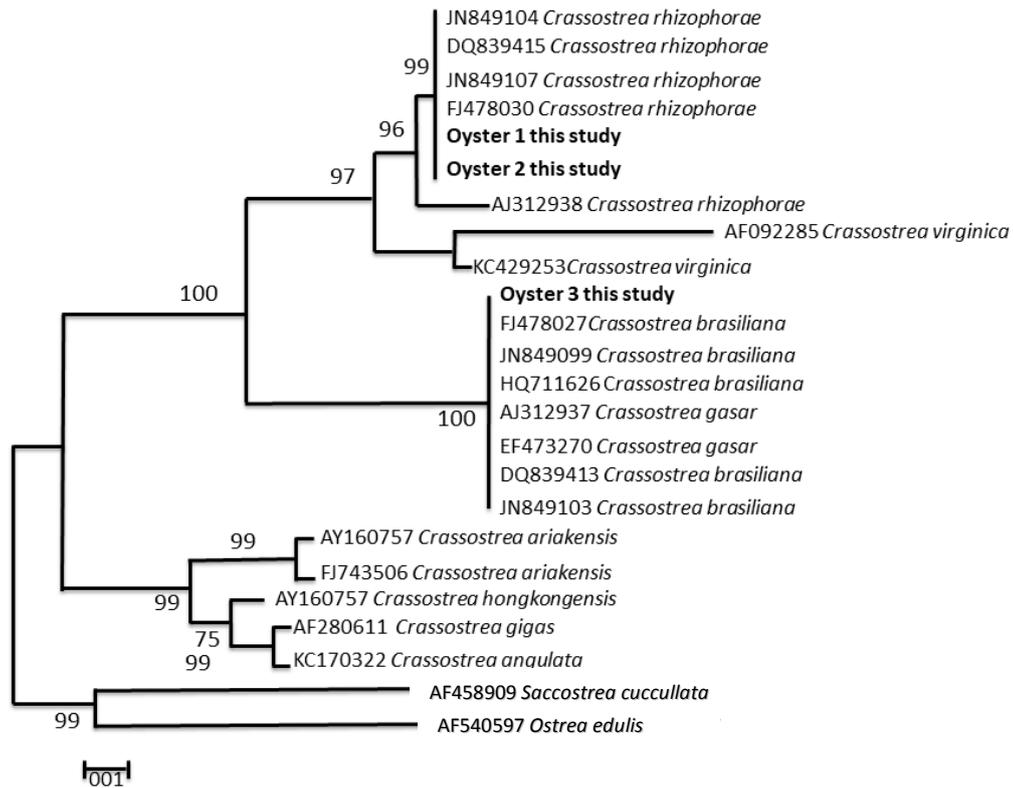


Figura 4. Árvore filogenética obtida a partir do Método de Neighbor-Joining para os gêneros *Crassostrea* e *Saccostrea cucullata* com base em 16S rRNA, com inclusão das ostras deste estudo. *Ostrea edulis* foi utilizada como grupo externo.

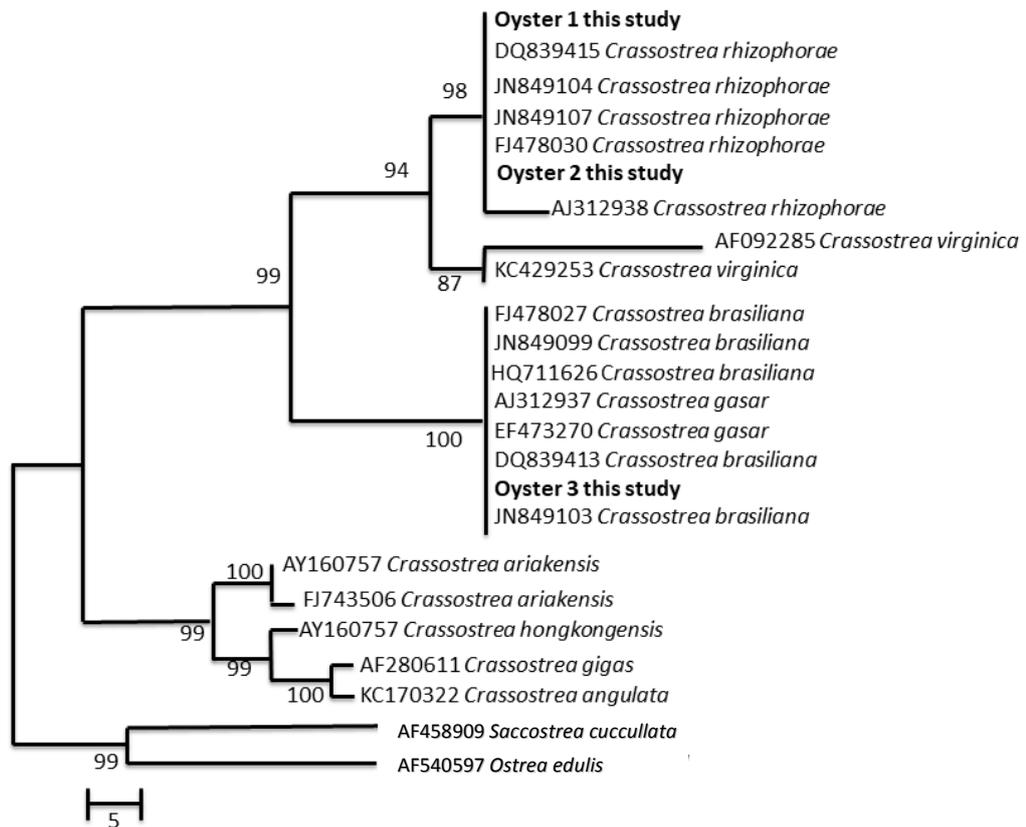


Figura 5. Árvore filogenética obtida a partir do Método da Parsimônia para os gêneros *Crassostrea* e *Saccostrea cucullata* com base em 16S rRNA, com inclusão das ostras deste estudo. *Ostrea edulis* foi utilizada como grupo externo.

Tabela 2. Locais de coleta (=St, dispostas no sentido norte-sul) com as respectivas coordenadas e municípios de localização e espécie (s) de ostras encontradas em cada estação amostral. A letra “a” indica ostras coletadas de estoque natural, sobre raízes e caules de *Rhizophorae mangle*; a notação “a*” indica ostras de estoques naturais incrustadas sobre rochas e estruturas artificiais de concreto; “a**” indica ostras provenientes de estoques naturais, aderidas na parte mais basal das raízes de *R. mangle* ou parcialmente enterradas no sedimento (St12); a letra “b” = ostras de cultivo do tipo tabuleiro ou mesa; a letra “c” indica ostras de cultivo em sistema espinhel.

Locais	Coordenadas	Município	N	Espécie
St1-Baía de Todos os Santos ^b	12°39'27.00"S/ 38°51'20.00" W	Cachoeira	30	<i>C. gasar</i>
St2-Ilha Pequena ^a	13°55'08.18"S/39°00'09.63"W	Camamu	30	<i>C. rhizophorae</i>
St3-Cajaíba ^a	13°57'39.72"S/39°01'24.73"W	Camamu	30	<i>C. rhizophorae</i>
St4-Porto do Campo ^a	13°57'07.79"S /39°02'09.48"W	Camamu	30	<i>C. rhizophorae</i>
St5-Ilha do Caranguejo ^a	13°57'09.62"S/ 39°00'00.22"W	Camamu	30	<i>C. rhizophorae</i>
St6-Ponta de Caieiras ^a	13° 58'13.90"S/39°00'13.80"W	Camamu	10	<i>C. rhizophorae</i>
St7 _a -Ilha de Tanques ^c	14°00'52.30"S/39°58'09.71"W	Maraú	10	<i>C. gasar</i>
St7 _b -Ilha de Tanques ^a	14°00'52.30"S/39°58'09.31"W	Maraú	10	<i>C. rhizophorae</i>
St8 _a -Maraú ^c	13°58'32.51"S/38°57'39.03"W	Maraú	10	<i>C. gasar</i>
St8 _b -Maraú ^a	13°58'32.51"S/38°57'39.03"W	Maraú	10	<i>C. rhizophorae</i>
St9-Barra do Itaípe ^a	14°46'11.30"S/ 39°03'11.60"W	Ilhéus	30	<i>C. rhizophorae</i>
St10-Baía do Pontal ^{a*}	14°48'10.21"S/39°02'20.79"W	Ilhéus	30	<i>C. rhizophorae</i> <i>C. gasar</i>
St11-Cais ^{a*}	15°41'00.75"S/38°56'38.06"W	Canavieiras	30	<i>C. rhizophorae</i>
St12-Campinhos ^{a**}	15°42'41.41"S/38°55'56.17"W	Canavieiras	30	<i>C. gasar</i>

DISCUSSÃO

Por não ter havido diferenciação genética entre *C. gasar* e *C. brasiliiana*, neste estudo assume-se que a segunda está em sinonímia com a primeira, respeitando-se a Lei da Prioridade do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, em concordância com análises genéticas feitas em estudos anteriores na costa brasileira (VARELA *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2010a; LAZOSKI *et al.*, 2011).

ABSHER (1989) já havia chamado a atenção, há duas décadas, com base em análise morfológica das larvas e também por eletroforese, para a existência de *C. rhizophorae* e de *C. brasiliiana* (= *C. gasar*) no litoral do estado do Paraná, para a alta plasticidade fenotípica das valvas, assim como para a ocorrência dessas espécies em habitats levemente distintos, o que foi confirmado neste estudo, já que a primeira, geralmente denominada de “ostra-do-mangue” adere-se geralmente a raízes aéreas de *Rhizophorae mangle* (L.), o mangue vermelho, mas também a substratos duros como rochas e outros substratos consolidados (RIOS, 2009), razão pela qual essa ostra é também denominada de “ostra da pedra” (NASCIMENTO, 1983), enquanto que *C. gasar* (= *C. brasiliiana*), também denominada de “ostra do fundo” (LEGAT *et al.*, 2017), tem ocorrência sobre rochas no infralitoral (ABSHER, 1989; GALVÃO *et al.*, 2013) ou em regiões entremarés baixas, como visto no presente estudo. Essa última ostra é referida como tendo tamanho maior em relação à primeira (ABSHER, 1989; CHRISTO e ABSHER, 2006), o que também confirmado neste estudo.

Crassostrea gasar tem se mostrado favorável para o cultivo (PEREIRA *et al.*, 2001; LEGAT *et al.*, 2017), sendo coincidentemente a ostra identificada nos cultivos em sistema *long line* da Baía de Camamu (estações amostrais St7_a e St8_a) e nas amostras provenientes do cultivo em mesa da Baía de Todos os Santos (St1). Por outro lado, a coleta de sementes e o cultivo *C. rhizophorae*, seja em sistema mesa ou espinhel, não se mostrou favorável na região (observação pessoal), o que reforça a importância de mais estudos e o investimento no aprimoramento da técnica de cultivo de *C. gasar*, uma tendência já em curso em estados do sul e sudeste brasileiros (Santa Catarina, Paraná e São Paulo), mas ainda não explorada no nordeste brasileiro, uma região também propícia ao cultivo dessa espécie.

CONCLUSÃO

Duas espécies de ostras foram geneticamente identificadas no litoral do estado da Bahia: *C. rhizophorae* e *C. gasar* (= *C. brasiliiana*), morfológicamente semelhantes, mas com características ecológicas (habitat) levemente distintas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESB pela bolsa de doutorado ao primeiro autor e pelo financiamento do projeto (TSC 0010/2011); a Valéria Camilo pela coleta das amostras na Baía de Todos os Santos e a Ricardo Lemos Viana, pela confecção do mapa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSHER, T.M. 1989 *Populações naturais de ostras do gênero Crassostrea do litoral do Paraná – Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento*. São Paulo (SP), Brasil. 185p. (Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo).
- AMARAL, V.S. and SIMONE, L.R.L. 2014 Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94 (4): 811-836.
- BOUCHET, P. and GOFAS, S. 2012 *Crassostrea* Sacco, 1897. In: Mollusca Base (2017) (Accessed through: World Register of Marine Species; <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=138297> (29 June 2017)).
- CHRISTO, S.W. and ABSHER, T.M. 2006 Reproductive period of *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) and *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Ostreidae) in Guaratuba Bay, Paraná, Brazil. *Journal of Coastal Research*, 39 (Special Issue): 1215-1218.
- GALTSOFF, P.S. 1964 The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Washington, D. C.: US Government Printing Office, *Fish and Wildlife Service Bulletin*, 64 (1): 480p.
- GALVÃO, M.S.N.; PEREIRA, O.M.; HILSDORF, A.W.S. 2013 Molecular identification and distribution of mangrove oysters (*Crassostrea*) in an estuarine ecosystem in Southeast Brazil: implications for aquaculture and fisheries management. *Aquaculture Research*, 44 (10): 1589-1601.
- HALL, T.A. 1999 BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41 (2): 95-98.
- IGNACIO, B.L.; ABSHER, T.M.; LAZOSKI, C.; SOLE-CAVA, A.M. 2000 Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology*, 136(1): 987-991.
- INTROINI, G.O.; MEDEIROS, D.; VITTORAZZI, S.E.; LOURENCO, L.B.; RECCO-PIMENTEL, S.M. 2012 Sperm ultrastructure in *Crassostrea* oysters from Cananeia in the

Southeast of Brazil (unpublished). Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (accessed 14 August 2017).

JUNG, H.T.; EYUN, S.I.; KIM, W.J. 2009 Inferring Korean Oyster Phylogenies including the East Asia *Crassostrea ariakensis* and its Population Structure from Genetic Markers (unpublished). Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (accessed 19 August 2017).

LAM, K.; MORTON, B.; SLACK-SMITH, S. 2002 First record of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, from Oyster Harbour, Albany, southwestern Western Australia (unpublished). Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (accessed 19 August 2017).

LAM, K.K.Y. and MORTON, B. 2001 Morphological, ecological and mitochondrial DNA 16S sequence distinctions between and within *Saccostrea* (Bivalvia: Ostreidae) populations from Hong Kong and Australia (unpublished). Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (accessed 19 August 2017).

LAPÉGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P.; THIRIOTUIE-VREUX, C.; BOUDRY, P. 2002 Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. *Biological Bulletin*, 202 (3): 232-242.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLÉ-CAVA, A.M. 2011 Phylogeny and phylogeography of commercially important Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. *Marine Ecology Progress Series*, 426 (3): 197-212.

LEGAT, J.F.A.; PUCHNICK-LEGAT, A.; FOGAÇA, F.H.S.; TURECK, C.R.; SUHNEL, S.; MELO, C.M.R. 2017 Growth and survival of bottom oyster *Crassostrea gasar* cultured in the northeast and south of Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43 (2): 172-184.

LENZ, T.; BOEHS, G. 2011 Ciclo reproductivo del ostión de manglar *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) en la Bahía de Camamu, Bahia, Brasil. *Revista de Biología Tropical*, 59 (1): 137-49.

McCARTHY, K.R.; BROWN, R.F.; JOHNSTON, M.B.; WHEELER, A.P. 1998 Phylogenetic comparison of the family Bivalvia using the 16S-rRNA gene in correlation with shell microstructure (unpublished). Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/> (accessed 19 August 2017).

MELO, A.G.C.; VARELA, E.S.; BEASLEY, C.R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; GAFFNEY, P.M.; REECE, K.S.; TAGLIARO, C.H. 2010_a Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). *Genetics and Molecular Biology*, 33 (3): 564-572.

MELO, C.M.R.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; SOLÉ-CAVA, A.M.; LAZOSKI, C. 2010_b *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. *Biological Invasions*, 12 (3): 441-449.

NASCIMENTO, I.A. 1983 Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. *Ciência e Cultura*, 35 (7): 871-876.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. World Health Organization. 2012 *Manual of diagnostic test for aquatic animals*. Paris, France.

PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILAN, W.O.; STICE, L; GRABOWSKI, G. 1991 *The Simple Fool's Guide to PCR*. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.

PEREIRA, O.P.; MACHADO, I.C.; HENRIQUES, M.B.; YAMANAKA, N. 2001 Crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* semeada sobre tabuleiro em diferentes densidades na região estuarino-lagunar de Cananéia-SP (25° S, 48° W). *Boletim do Instituto de Pesca*, 27 (2): 163-174.

PIE, M.R.; RIBEIRO, R.O.; BOEGER, W.A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R.M.; ANGELO, L. 2006 A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster

species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. *Aquaculture Research*, 37 (1): 1598-1600.

RIOS, E. C. 2009 *Compendium of Brazilian Sea Shells*. Evangraf, Rio Grande, Brazil.

SAITOU, N. and NEI, M. 1987 The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406-425.

SHARMA, P.P.; ZARDUS, J.D.; BOYLE, E.E.; GONZALEZ, V.L.; JENNINGS, R.M.; MCINTYRE, E.; WHEELER, W.C.; ETTER, R.J; GIRIBET, G. 2013 Into the deep: a phylogenetic approach to the bivalve subclasse Protobranchia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69 (1): 188-204.

TACK J. F.; BERGHE, E.; POLK P. H. 1992 Ecomorphology of *Crassostrea cucullata* (Born, 1778) (Ostreidae) in a mangrove creek (Gazi, Kenya). *Hydrobiologia*, 247 (1): 109-117.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013 MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725-2729.

VARELA, E.S.; BEASLEY, C.R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I., MARQUES-SILVA, N.S.; TAGLIARO, C.H. 2007 Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *Journal of Molluscan Studies*, 73 (3): 229-234.

WANG, P.Y. 2012 Morphological Characteristics and Molecular Phylogenetic Analysis of the Common Oyster from the Houhai Bay in Putian (unpublished). Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> (accessed 30 August 2017).

YU, Z.; KONG, X.; IU, Y. 2000 Sequencing of ribosomal internal transcribed spacer regions (ITS-1 and ITS-2) and two mitochondrial gene fragments (16S and COI) in *Crassostrea gigas* and their potential uses (unpublished). Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> (accessed 30 August 2017).

CAPÍTULO 3

Perkinsus beihaiensis (**Perkinsozoa**) em ostras do Litoral Sul da Bahia

Artigo submetido ao periódico Brazilian Journal of Biology

Recebido em 11 de maio de 2016.

Aprovado em 30 setembro de 2016, para publicação impressa em maio de 2018, v. 78,
n° 2.

Disponibilizado *online* em 17 de agosto de 2017 (Apêndice).

Normas da revista: Anexo II

***Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) em ostras do Litoral Sul da Bahia**

M. S. A. LUZ, F. S. CARVALHO, H. C. OLIVEIRA e G. BOEHS

Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Programa de Pós Graduação em Ciência Animal; Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, CEP 45652-900, Ilhéus, Bahia, Brasil

Resumo

Este estudo relata o patógeno *Perkinsus beihaiensis* em ostras do gênero *Crassostrea* no litoral do Estado da Bahia (Brasil), sua prevalência, intensidade de infecção e correlação com a salinidade. As ostras (n = 240) foram coletadas entre outubro e dezembro de 2014 em oito estações amostrais entre as latitudes 13°55'S e 15°42'S. Os procedimentos laboratoriais incluíram análise macroscópica, histologia, cultivo em meio de tioglicolato de Ray (RFTM), reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA. PCR e sequenciamento foram também utilizados para a identificação genética das ostras. Foram identificadas duas espécies de ostras: *Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar* (= *C. brasiliiana*). Em ambas as espécies, *P. beihaiensis* foi a única espécie de *Perkinsus* detectada. Em *C. rhizophorae*, a prevalência média foi de 82,8% por histologia e de 65,2% por RFTM. Em *C. gasar*, as prevalências foram de 70,5% e 35,7%, respectivamente. A maior prevalência de *P. beihaiensis* em *C. rhizophorae* foi provavelmente influenciada pela salinidade, com a qual este apresentou correlação positiva ($r > 0,8$). Em ambas as espécies, *P. beihaiensis* esteve localizada principalmente no epitélio gástrico. A infecção foi geralmente leve ou moderada, sem danos aparentes aos hospedeiros, mas em casos de infecção severa, houve reação hemocitária e desorganização de tecidos. As prevalências geralmente altas na região sugerem que as ostras devam ser monitoradas com relação a este patógeno, principalmente em áreas de cultivo.

Palavras-chave: bivalves, doenças, patologia, salinidade.

Abstract

This study reports the pathogen *Perkinsus beihaiensis* in oysters of the genus *Crassostrea* on the coast of the State of Bahia (Brazil), its prevalence, infection intensity and correlation with salinity. Oysters (n = 240) were collected between October and December 2014 at eight sampling stations between latitudes 13°55'S and 15°42'S. The laboratory procedures included macroscopic analysis, histology, culture in Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM), Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequencing. PCR and sequencing have been used for the genetic identification of oysters as well. Two species of oysters have been identified: *Crassostrea rhizophorae* and *C. gasar* (= *C. brasiliiana*). In both oyster species *P. beihaiensis* was the only *Perkinsus* species detected. In *C. rhizophorae*, the average prevalence was 82.8% by histology and 65.2% by RFTM. In *C. gasar*, the prevalences were 70.5% and 35.7%, respectively. The higher prevalence of *P. beihaiensis* in *C. rhizophorae* was probably influenced by salinity, with which was positively correlated ($r > 0.8$). In both oysters, *P. beihaiensis* was located mainly in the gastric epithelium. The infection was generally mild or moderate, without apparent harm to the hosts, but in cases of severe infection, there was hemocytical reaction and tissue disorganization. The generally high prevalence in the region suggests that oysters should be monitored with respect to this pathogen, especially in growing areas.

Keywords: bivalves, diseases, pathology, salinity.

1. Introdução

É conhecido que para o sucesso de cultivo de moluscos são essenciais ao manejo e ao monitoramento de doenças, que podem comprometer a produção. Segundo revisão de Boehs et al. (2012), na costa brasileira foram inventariados vários patógenos em moluscos bivalves na última década, incluindo representantes de bactérias, protozoários, fungos e metazoários. Mas, de modo geral, tanto no Brasil quanto no restante da América do Sul, há ainda pouca informação sobre enfermidades que acometem moluscos de interesse econômico, principalmente no que se refere ao ciclo de vida de patógenos e a interação destes com os respectivos hospedeiros.

Dentre os patógenos já relatados na costa brasileira, está o gênero *Perkinsus* Levine, 1978 (Perkinsozoa), que afeta moluscos em várias partes do mundo, incluindo alguns bivalves de grande interesse econômico, como as ostras. Sete espécies foram descritas em todo o mundo, duas das quais (*P. marinus* e *P. olseni*) são notificáveis à Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2012). No Brasil, quatro espécies foram registradas nos últimos cinco anos, todas no Nordeste: *P. beihaiensis*, *P. marinus*, *P. olseni* e *P. chesapeakei* (Dantas-Neto, 2015).

Perkinsus beihaiensis Moss, Xiao, Dungan and Reece, 2008 foi descrita pela primeira vez no sul da China (Moss et al., 2008) em *Crassostrea ariakensis* (Fujita, 1913) e em *C. hongkongensis* Lam and Morton, 2003. Sanil et al. (2012) relataram essa espécie em *C. madrasensis* (Preston, 1916) da Índia. No Brasil, *P. beihaiensis* foi registrada em espécies de *Crassostrea* no Nordeste do Brasil, nos estados do Ceará (Sabry et al., 2009; Sabry et al., 2013), Paraíba (Queiroga et al., 2015) e Bahia (Luz e Boehs, 2016) e também em *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Veneridae) (Ferreira et al., 2015), no Ceará. No geral, ainda há poucas informações sobre essa espécie em termos de sua ecologia, potenciais hospedeiros e riscos para a produção de moluscos.

As ostras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) (Lamarck, 1819) são importantes recursos para o consumo e comercialização de extrativistas na costa brasileira. O cultivo desses moluscos já é praticado em vários locais. Este estudo relata a presença de *P. beihaiensis* nestas espécies no estado da Bahia, com informações sobre patologia, intensidade de infecção, prevalência e correlação com a salinidade.

2. Material e Métodos

2.1. Coletas

As coletas foram feitas em oito estações amostrais (St1-8), localizadas entre as latitudes 13°55'S e 15°42'S no litoral sul da Bahia, num trecho de cerca de 200 km de extensão. As estações amostrais St1-St4 localizaram-se no município de Camamu, St5 e St6 em Ilhéus e St7 e St8 em Canavieiras (**Figura 1; Tabela 1**). As amostragens foram feitas entre outubro e dezembro de 2014, mediante autorização de número 20912-3, concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Brasil.

Os exemplares foram retirados com o auxílio de uma faca, nos troncos ou raízes do mangue vermelho *Rhizophorae mangle* L. (St1-St5 e St8) ou em rochas e estruturas de concreto (St6 e St7), sempre em maré baixa de sizígia. Em cada estação amostral foram coletadas 30 ostras. Estas foram trazidas em baldes contendo uma pequena porção de água do mar e processadas em um período máximo de 6 horas após a sua coleta. A temperatura e a salinidade da água foram registradas em cada dia de amostragem usando, respectivamente, um termômetro de mercúrio padrão e um refractômetro óptico Atago S/Mill.

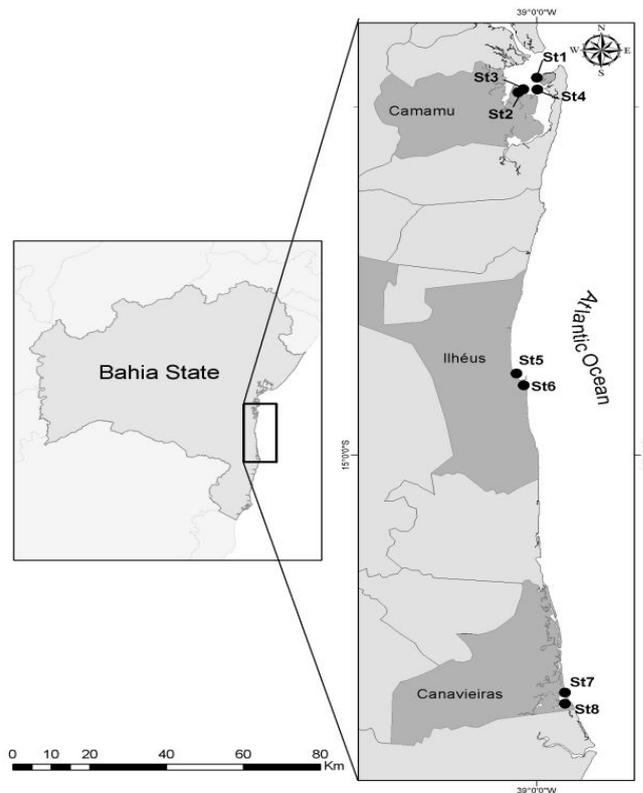


Figura 1. Mapa da área de estudo, com a indicação dos pontos de coleta (St1-St8).

2.2. Procedimentos Laboratoriais

As ostras foram inicialmente medidas quanto ao seu maior eixo (altura = eixo dorso-ventral), segundo Galtsoff (1964). Após a abertura, os espécimes foram analisados macroscopicamente quanto a sinais clínicos de *Perkinsus* sp., tais como perda de peso, aparência pálida, encolhimento do manto e presença de pústulas, conforme relatado anteriormente por Bower et al. (1994) e por Bondad-Reantaso et al. (2001).

Foi feita uma secção transversal de cerca de 5 mm em cada espécime, que foi fixada na solução de Davidson (Shaw e Battle, 1957) durante 24 a 30 horas. Os tecidos foram processados por técnica histológica clássica, incluindo desidratação em uma série de concentrações crescentes de álcool e incorporação em parafina. Secções de espessura de 5 μ m foram cortadas usando um microtomo e foram coradas com Harris hematoxilina e eosina (H & E) (Howard et al., 2004). As secções histológicas foram analisadas no microscópio de luz

Olympus a 40 e 100 x. Após a análise, as lâminas foram depositadas no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM) na Universidade Estadual de Santa Cruz, sob os cuidados dos autores.

As brânquias e o reto de cada ostra ($n = 240$) foram removidos e incubados para cultura no meio fluido de tioglicolado de Ray - RFTM, desenvolvido por Ray (1966), seguindo o protocolo internacional (OIE, 2012) com adição de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina) e antifúngico (Nistatina), para inibir a proliferação de microorganismos. O meio de cultura foi mantido no escuro durante 7 dias à temperatura ambiente (20-25°C). Os tecidos foram macerados e corados em solução de iodo a 3% para visualização sob microscópio de luz.

Amostras com resultado positivo em RFTM foram submetidas à PCR. A extração total de DNA foi realizada a partir de subamostras da glândula digestiva e brânquias, que foram preservadas em etanol a 95%. Para este passo, utilizou-se DNAzol (*Invitrogen*®) seguindo o protocolo do fabricante e protocolo de fenol-clorofórmio proposto pelo OIE (2012). Para as reações de PCR utilizou-se o par de iniciadores PerkITS 85/750, exclusivo para membros do gênero *Perkinsus* (exceto *P. qugwadi*) (Casas et al., 2002). As reações de PCR foram realizadas em volumes de 12,5 uL, contendo 100-200ng de DNA genômico, 1x concentrado de tampão de PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTP, 10 picomol de cada iniciador e 1 U Taq DNA polimerase (*Invitrogen*®). O DNA de *P. beihaiensis* identificado anteriormente por Luz e Boehs (2016) foi usado como controle positivo. O protocolo incluiu: desnaturação do DNA a 94 °C durante 5 minutos; 35 ciclos de amplificação a 94 °C durante 40 segundos, 60°C durante 40 segundos e 72 °C durante 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 1,5%, corados com *Syber Safe*® e visualizados usando luz UV. Vinte amostras positivas foram selecionadas

aleatoriamente para sequenciação de DNA. As amostras foram sequenciadas pela ACTGene Molecular Analysis (Porto Alegre, Brasil). A sequência obtida foi depositada no GenBank.

2.3. Tratamento dos Dados

A prevalência do patógeno foi calculada como o número de ostras infectadas dividido pelo número total de ostras analisadas (Bush et al., 1997). A intensidade da infecção (análise por RFTM) foi calculada de acordo com a escala desenvolvida por Ray (1954) e modificada por Sabry et al. (2009), nos seguintes níveis (L): Nenhuma infecção: zero hipnósporos na lâmina inteira (100 ×) (= L0); Infecção muito leve: até 10 hipnósporos na lâmina inteira (100 ×) (= L1); Infecção suave: 11-100 hipnósporos na lâmina inteira (100 ×) (= L2); Infecção moderada: pelo menos 40 hipnósporos observados em 10 campos diferentes (400 ×) (= L3); Infecção grave: mais de 40 hipnósporos observados em 10 campos diferentes (400 ×) (= L4).

A análise de correlação de Pearson foi utilizada para relacionar os dados de prevalência e a intensidade da infecção com a salinidade nas estações de amostragem e espécies e um teste t foi associado para mostrar diferenças significativas. Foi utilizado o ASSISTAT, versão 7.7 beta. Uma ordenação multivariada (Análise de Componentes Principais - PCA), gerada pelo software MVSP, foi utilizada para mostrar graficamente as correlações. O nível de confiança foi de 95%. Para garantir a alta confiabilidade dos valores de salinidade de cada local, para essas análises foram utilizadas a média dos valores obtidos neste estudo com registros feitos ao longo de um ano em cada região, como segue: Lenz e Boehs (2011) e Luz e Boehs (2015) em Camamu, Boehs et al. (2010) em Ilhéus e Zeidan et al. (2012) em Canavieiras.

3. Resultados

A temperatura variou entre 26 e 29°C (Média = 27,8°C; DP \pm 1,12) e a salinidade entre 18 e 36‰ (Média = 29,6 \pm 7,67) (**Tabela 1**).

Nas análises moleculares para confirmar o patógeno, os *amplicons* obtidos na PCR apresentaram 700 pb, tamanho esperado para protozoários do gênero *Perkinsus*. O sequenciamento comprovou tratar-se de *P. beihaiensis*, com 98 a 100% de similaridade com as sequências disponíveis no NCBI, como as depositadas por Sanil et al. (2012) e Sabry et al. (2013), para a Índia e o nordeste setentrional do Brasil, respectivamente. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank com número KX923545.

Em uma ostra infectada por *P. beihaiensis* coletada na St7, foram observadas pequenas pústulas, com aproximadamente 1 mm de diâmetro, de cor branco-amarelada no manto e brânquias. Nos demais exemplares (n = 239), não houve qualquer sinal macroscópico indicativo de enfermidade.

Tabela 1. Informações sobre as estações de coleta (coordenadas, localização e dados pontuais de temperatura e salinidade) e resultados de prevalência (P) de *Perkinsus beihaiensis* em duas espécies de ostras no litoral sul da Bahia, para 240 exemplares coletados entre outubro e dezembro de 2014 e analisados por histologia e Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), sendo: - Ausência da espécie ou de dados; Cg = *Crassostrea gasar*; Cr = *Crassostrea rhizophorae*; S = salinidade; T = temperatura.

Estação	Coordenadas	Município	T (°C)	S (‰)	P (%) - Histology		P (%) - RFTM	
					Cr	Cg	Cr	Cg
St1 (Ilha Pequena)	13°55'. 818''S, 39°. 00.963''W	Camamu	29	36	100	-	93,3	-
St 2 (Cajaíba)	13°56'. 848''S, 39°. 00.867''W	Camamu	28	36	96,6	-	86,6	-
St3 (Porto do Campo)	13°57'. 779''S, 39°. 02'. 948''W	Camamu	27	36	86,6	-	83,3	-
St4 (Ilha do Caranguejo)	13°57'. 962''S, 39°. 00.022'W	Camamu	27	36	86,6	-	86,6	-
St5 (Barra do Itaipe)	14° 46'. 113''S, 39° 3'. 116''W	Ilhéus	26	18	60,7	-	25,0	-
St6 (Baía do Pontal)	14°48'10.21''S, 39°2'20.79''W	Ilhéus	28	30	66,6	58,3	16,6	4,16
St7 (Cais)	15°41'. 075''S, 38°56'38.06''W	Canavieiras	29	20	-	86,6	-	76,6
St8 (Campinhos)	15°42'41.41''S, 38°55'56.17''W	Canavieiras	29	25	-	66,6	-	26,6
Média/Desvio Padrão	-	-	27,8/±1,12	29,6/±7,67	82,8/±15,9	70,5/14,5	65,2/34,6	35,7/37,0
Resultados do χ^2	-	-	-	-	p= 0,19	p= 0,19	P=0,86	P=0,86

Trofozoítos, tipicamente com um grande vacúolo e núcleo periférico, assim como de esquizontes (trofozoítos em divisão) foram observados nos tecidos das duas espécies de ostras. Os trofozoítos, com tamanho entre 3 e 10 μ m (Média = 6,8; DP \pm 2,03; n = 240), foram vistos predominantemente no trato digestivo, preferencialmente no epitélio do estômago, mas estes também foram observados no manto e no músculo adutor, em baixa intensidade. No trato digestivo, em casos de infecção grave, houve infiltração hemocítica moderada e desorganização tecidual.

Considerando-se todos os locais, a prevalência média foi de 82,8% \pm 15,9 em *C. rhizophorae* e de 70,5% \pm 14,5 em *C. gasar* (**Tabela 1**).

Os hipnósporos resultantes do cultivo em RFTM apresentaram grande variação de tamanho, isto é, mediram entre 2 e 75 μ m, sendo que os menores valores foram observados nas culturas do material proveniente das estações St3 (2-4 μ m) e St7 (2-8 μ m). A prevalência média foi de 65,2% \pm 34,6 em *C. rhizophorae* e de 35,7% \pm 37,0 em *C. gasar*, notadamente mais baixa em relação aos resultados da histologia e mais alta em *C. rhizophorae* (**Tabela 1**).

Níveis de infecção moderados (L3) a severos (L4) foram observados em *C. rhizophorae* nas estações St1-St4, no município de Camamu e em *C. gasar* da St7 em Canavieiras. Nas estações St5 e St6 (Ilhéus) e St8 (Canavieiras) predominou o nível nulo de infecção ou então, os exemplares apresentavam nível muito baixo (L1) ou baixo (L2) de infecção (**Figura 2 e Figura 3**).

As análises estatísticas evidenciaram correlação positiva entre a prevalência de *P. beihaiensis* e a salinidade ($r = 0.8798$; $p < 0.01$). A salinidade também esteve positivamente correlacionada com os níveis L2 ($r = 0.7437$; $p < 0,05$), L3 ($r = 0.7261$; $p < 0,05$) e L4 de infecção ($r = 0.8841$; $p < 0,01$) e negativamente correlacionada com o nível L0 (ausência da infecção) ($r = -0.7526$) ($p < 0,05$). Os locais com alta prevalência

também estiveram fortemente correlacionados com níveis severos de infecção ($r = 0,8803$; $p < 0,01$).

Nas estações com alta salinidade (St1-St4, onde só ocorreram *C. rhizophorae* e St7, onde ocorreu apenas *C. gasar*), foram observados, tanto alta prevalência de *P. beihaiensis* quanto altos níveis de infecção. Os componentes 1 e 2 da Análise de Componentes Principais - PCA explicaram 86,5% da variabilidade total dos dados (Figure 3).

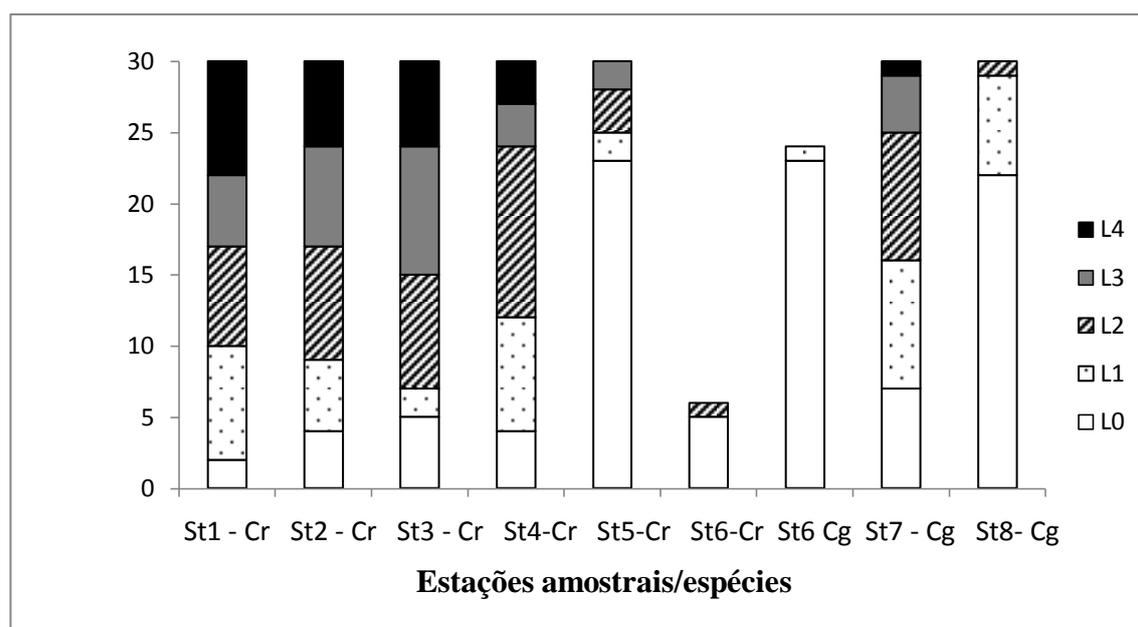


Figura 2. Frequência absoluta dos níveis de intensidade de infecção* de *Perkinsus beihaiensis* nas ostras *Crassostrea rhizophorae* (Cr) e *C. gasar* (Cg) do litoral sul da Bahia, observados em microscopia de luz após cultivo em Fluido de Tioglicolato de Ray - RFTM. N = 240. *Níveis de infecção segundo classificação de Ray (1954), onde: L0 = Infecção nula; L1= Infecção muito baixa; L2= Infecção baixa; L3= Infecção moderada; L4= Infecção severa.

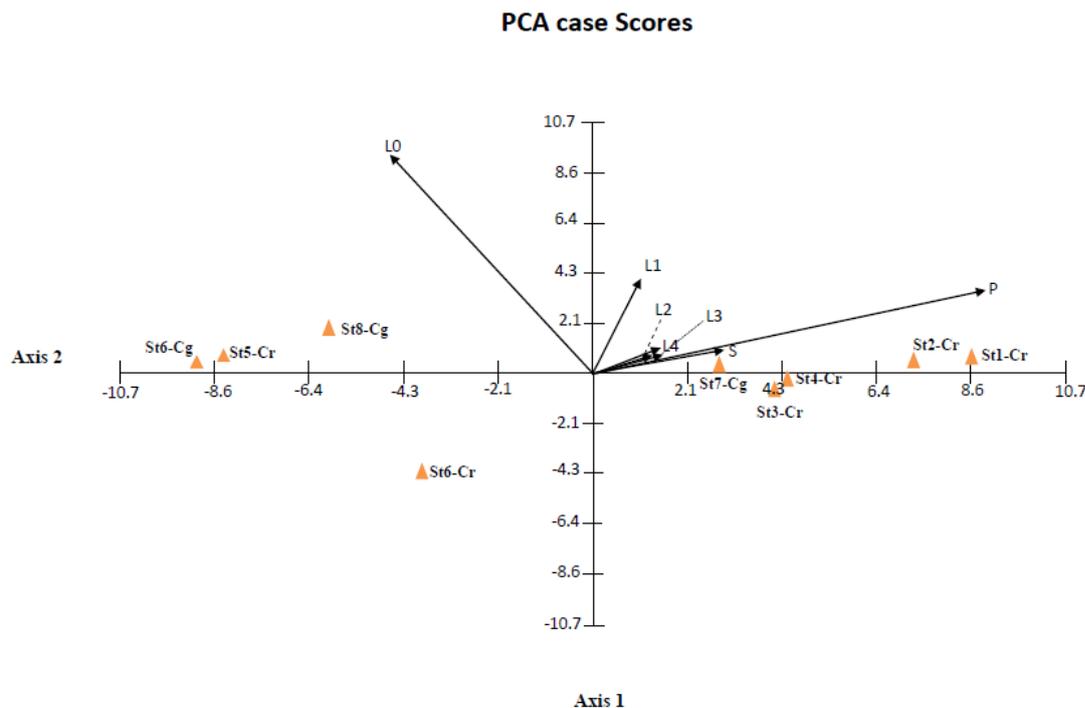


Figura 3. Resultado gráfico da Análise de Componentes Principais (PCA), evidenciando correlação positiva entre a prevalência (P) e intensidade de infecção (níveis 0-4) de *Perkinsus beihaiensis* com a salinidade (S) nas ostras *Crassostrea rhizophorae* (Cr) e *C.gasar* (Cb). St = estações amostrais (St1-St8).

4. Discussão

Em ambas as espécies de ostras, foi *Perkinsus beihaiensis* foi detectada como a única espécie de *Perkinsus* presente, com localização preferencial no epitélio digestivo, especialmente no estômago e em baixo número, também no manto e músculo adutor. A localização preferencial de *P. beihaiensis* no epitélio digestivo foi relatada em estudos anteriores sobre o gênero *Crassostrea* (Moss et al., 2008; Sanil et al., 2012; Sabry et al., 2013; Queiroga et al., 2015; Luz e Boehs, 2016).

Ostras com infecção grave (nível 4, escala de Ray) apresentaram desorganização do epitélio gástrico e intestinal e foram avaliados como comprometidos pela infecção. Por sua vez, tanto no manto como no músculo adutor, assim como em ostras que apresentavam baixo nível de infecção, não houve mudanças nos tecidos. Sanil et al. (2012) relataram a destruição de túbulos digestivos em alguns casos de infecção por *P. beihaiensis*. Moss et al. (2008) relataram lesões epiteliais e necrose no estômago,

intestino e glândula digestiva. De acordo com Villalba et al. (2004), em infecções mais severas causadas por *Perkinsus*, como as causadas por *P. marinus*, pode ocorrer emaciação do músculo adutor, com conseqüente abertura involuntária das valvas, perda de peso, encolhimento do manto, comprometimento do sistema imunológico e morte do hospedeiro.

Comparando-se os resultados de prevalência de *P. beihaiensis* deste estudo com outros obtidos em *Crassostrea* spp. no Brasil, verifica-se que os valores obtidos no litoral da Bahia são maiores. Considerando apenas os resultados obtidos pela histologia, Sabry et al. (2013) encontraram prevalências entre 3 e 20% no estado do Ceará, em uma região com salinidade média de 33,1‰ e Queiroga et al. (2015) verificaram prevalência média de 48,9% no estado da Paraíba, mas não mencionaram valores de salinidade. No estado da Bahia, Luz e Boehs (2016) encontraram anteriormente uma média de 93,3% de prevalência na Baía de Camamu (Bahia), em uma região com salinidade média de 28,4‰. Neste estudo, os valores de salinidade foram geralmente superiores a 20‰ e a prevalência média geral de *P. beihaiensis* foi de 78,7%, considerando as duas espécies de ostras.

Nossos resultados mostraram correlações positivas entre a salinidade e a prevalência e a intensidade da infecção, o que reforça os resultados de estudos anteriores (Volety, 2008; La Peyre et al., 2010). De acordo com Villalba et al. (2004), em alguns lugares, as variações sazonais da salinidade e da temperatura modulam a ocorrência de espécies do gênero *Perkinsus*. No Brasil, este patógeno foi detectado até o momento apenas na região Nordeste do país, onde, coincidentemente, as temperaturas são altas ao longo do ano.

Com relação à prevalência e níveis de infecção, geralmente maiores em *C. rhizophorae* em relação à *C. gasar*, concluímos que este resultado foi, em princípio,

afetado por níveis de salinidade, uma vez que a primeira espécie foi coletada em locais mais salinos. Entretanto, uma maior prevalência entre *C. rhizophorae* também foi observada na estação St6, onde houve a ocorrência simultânea das duas espécies, sugerindo que talvez *C. rhizophorae* seja mais severamente afetada por *P. beihaiensis* do que *C. gasar*. Assim, as diferenças ecológicas entre as duas espécies de ostra (*C. rhizophorae* habitat níveis entremarés ligeiramente mais altos em relação a *C. gasar*) podem ter influência na susceptibilidade a *P. beihaiensis*.

Quanto à maior sensibilidade da detecção de *P. beihaiensis* na histologia em relação ao RFTM, concluímos que essa diferença é devido ao uso de diferentes órgãos em cada uma das técnicas. O protocolo atualmente utilizado (OIE, 2012) indica o uso do reto e as brânquias para RFTM, onde parece haver uma menor concentração do patógeno em relação ao estômago, órgão geralmente incluído na análise histológica. Essa diferença já foi observada em estudos anteriores (Sabry et al., 2009; 2013; Ferreira et al., 2015; Luz e Boehs, 2016). Sugerimos o uso de mesmos órgãos em histologia e RFTM (e também em PCR), para obter maior uniformidade no diagnóstico.

A presença de pústulas em uma ostra infectada na estação St7 indica a possibilidade de usar o diagnóstico presuntivo como complemento de diagnóstico, no entanto, como observamos o evento em uma única ostra, a confiabilidade de ocorrência de evidências macroscópica do patógeno em questão ainda é baixa.

Concluímos que *P. beihaiensis* não afeta massivamente a saúde das ostras do Litoral Sul da Bahia. No entanto, para o desenvolvimento do cultivo de ostras, o monitoramento periódico desse patógeno deve ser enfatizado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pela bolsa de estudo concedida ao primeiro autor, e pelo financiamento do projeto, TSC 0010/2011.

Referências Bibliográficas

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O. **Parasitas e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira**. In: SILVA-SOUZA, A.T.; LIZAMA, M de L.A.; TAKEMOTO, R. (org.). Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos, Maringá, Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos. 1º ed. Maringá: Massoni, Cap. 8. p. 165-193. 2012.

BOEHS, G.; VILLALBA, A.; CEUTA, L.O.; LUZ, J.R. 2010. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river, Ilhéus, Bahia, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 103, no. 1, pp. 43-47. DOI: 10.1016/j.jip.2009.10.008

BONDAD-REANTASO, M.G.; McGLADDERY, S.E.; EAST, I.; SUBASINGHE, R.P. **Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases**. FAO Fisheries Technical Paper 402/2. Rome: FAO, 2001.

BOWER, S.M.; McGLADDERY, S. E.; PRICE, I. M., 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*, vol. 4, p. 1-199. DOI: 10.1016/0959-8030(94)90028-0

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology* vol.83, no. 4, pp. 575-583. DOI: 10.2307/3284227.

CASAS, S.M., VILLALBA, A. and REECE, K.S., 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the a etiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 50, no. 1, pp. 51-65.

DANTAS NETO, M. P., 2015. Patógenos na ostra *Crassostrea rhizophorae* de estuários da costa setentrional do Nordeste brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, 119 p.

FERREIRA, L.P., SABRY, R.C., DA SILVA, P.M, GESTEIRA, T.C.V., ROMAO, L. S., PAZ, M. P., FEIJO, R.G., DANTAS NETO, M.P. and MAGGIONI, R., 2015. First

report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. *Experimental Parasitology*, vol. 150, no. 1, pp. 67-70. DOI:10.1016/j.exppara.2014.07.012

GALTSOFF, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Washington, D. C.: US Government Printing Office, Fish Wildl Leaflet. vol. 64, 480 p.

HOWARD, D.W., LEWIS, E.J., KELLER, B.J. and SMITH, C.S., 2004. *Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans*. Massachusetts: Oxford. 218 p. NOAA Technical Memorandum.

LA PEYRE, M.K., CASAS, S.M., GAYLE, W., LA PEYRE, J., 2010. The combined influence of sub-optimal temperature and salinity on the in vitro viability of *Perkinsus marinus*, a protistan parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 105, no.1, pp. 176-181. DOI: 10.1016/j.jip.2010.06.010.

LENZ, T. and BOEHS, G., 2011. Ciclo reproductivo del ostión de manglar *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) en la Bahía de Camamu, Bahia, Brasil. *Revista de Biología Tropical*, vol. 59, no. 1, pp. 137-149.

LUZ, M.S.A. and BOEHS, G. 2016. *Perkinsus beihaiensis* (Perkinsozoa) in the oyster *Crassostrea rhizophorae* under cultivation and in natural stock in Camamu Bay, Bahia, northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, vol. 53, no. 2, pp. 191-198.

LUZ, M.S.A and BOEHS, G., 2015. Parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* from farmed and natural stocks in the Bay of Camamu, Bahia, northeastern Brazil. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, vol. 7, no 6, pp. 120-128. DOI: 10.5897/JPVB2015.0198

MOSS, J.A., XIAO, J., DUNGAN, C.F. and REECE, K.S., 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. Parasite in Oysters of Southern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 55, no. 2 pp.117-130. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00314.x

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2012. *Manual of diagnostic test for aquatic animals*. Paris: OIE.

QUEIROGA, F.R., VIANNA, R.T., VIEIRA, C.B., FARIAS, N.D. and DA SILVA, P.M., 2015. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. *Parasitology* (Cambridge. Online), vol. 142, no. 6, pp. 756-766.

RAY, S.M., 1954. *Biological studies of Dermocystidium marinum, a fungus parasite of oysters*. Houston: Rice Institute, 120 p. Doctoral Thesis in Natural Sciences.

RAY, S.M., 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, vol. 54, pp. 55-69.

SABRY, R.C., GESTEIRA, T.C.V., MAGALHÃES, A.R.M., BARRACCO, M.A., GUERTLER, C., FERREIRA, L.P., VIANNA, R.T. and DA SILVA, P.M., 2013. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti river estuary, Ceará state, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 112, no. 1, pp. 24-32.

SABRY, R.C., ROSA, R.D., MAGALHÃES, A.R.M., BARRACCO, M.A., GESTEIRA, T.C.V. and DA SILVA, P.M., 2009. First report of a *Perkinsus* sp. infecting Mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary - Ceará, Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 88, no. 1, pp. 13-23. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02136>.

SANIL, N.K., SUJA, G., LIJO, J. and VIJAYAN, K.K., 2012. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 98, no. 3, pp. 209-220.

SHAW, B.L. and BATTLE, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*, vol. 35, no. 3, pp. 325-347. <http://dx.doi.org/10.1139/z57-026>.

VILLALBA, A., REECE, K.S., ORDÁS, M.C., CASAS, S.M. and FIGUERAS, A., 2004. Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquatic Living Resources*, vol. 17, pp. 411-432.

VOLETY, A.K., 2008. Effects of salinity, heavy metals and pesticides on health and physiology of oysters in the Caloosahatchee Estuary, Florida. *Ecotoxicology*. vol. 17, no. 7, pp. 579–590. DOI 10.1007/s10646-008-0242-9

ZEIDAN, G.C., LUZ, M.S.A. and BOEHS, G., 2012. Parasites of economically important bivalves from the southern coast of Bahia State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 21, no. 4, pp. 391-398.

CAPÍTULO 4

**Avaliação do potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp.
em *Mus musculus***

**Avaliação do potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp.
em *Mus musculus***

Mariane dos Santos Aguiar Luz* ; Daniele de Santana Rocha; Juneo Freitas Silva;
George Rego Albuquerque; Guisla Boehs

Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC; Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal; Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, CEP 45652-900, Ilhéus, Bahia,
Brasil

Título resumido: Infecção experimental de *Perkinsus* e *Nematopsis*...

*Autor para correspondência

*Mariane Luz. Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado km
16, Salobrinho, Ilhéus, Bahia, Brasil. CEP 45652-160.*

Tel: + 55 073 3680-5361

e-mail: msaluz@uesc.br

Resumo

Os protozoários do gênero *Perkinsus* infectam moluscos bivalves de interesse econômico em vários países, sendo que duas das sete espécies conhecidas são de declaração obrigatória à Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE). *Nematopsis* Schneider, 1892 (Apicomplexa) é um protozoário frequente em bivalves, que utiliza como hospedeiros intermediários. Apesar de sua ampla distribuição e importância na patologia de moluscos, o potencial zoonótico de ambos os patógenos ainda não é conhecido. Neste estudo teve-se por objetivo avaliar o potencial zoonótico de *Perkinsus beihaiensis* e de *Nematopsis* sp. no camundongo Swiss (*Mus musculus*). Para tanto, foi feito um ensaio em que foram utilizadas *pools* da ostra *Crassostrea rhizophorae*, que foram submetidos à digestão péptica e inoculados nos camundongos por via intraperitoneal. Foram utilizados três grupos (G1-G3) com camundongos cada. Estes foram eutanasiados em intervalos de 15 (G1), 30 (G2) e 45 (G3) dias após a inoculação. Durante todo o período do experimento, os camundongos foram monitorados quanto a sinais clínicos. Após eutanásia, foram coletadas amostras de tecidos de vários órgãos, que foram analisados via histologia, cultivo em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) e por ferramentas moleculares. Nos animais inoculados observou-se alteração de peso do baço e do fígado, além da presença de nódulos, notadamente no fígado. Oocistos de *Nematopsis* sp. (Apicomplexa) foram observados no fígado, causando infiltrado inflamatório. *Perkinsus beihaiensis* foi observado apenas pela técnica de RFTM e pela análise de tecidos evidenciou-se o aumento das placas de Peyer (nódulos linfóides) no intestino delgado, concluindo-se que o fato ocorreu em reação a este patógeno. Com base nesses resultados, sugere-se que ambos os patógenos possuem potencial zoonótico e que por isso, monitoramentos devem ser realizados para garantir a qualidade de saúde do molusco e do consumidor.

Palavras-chave: Ensaio biológico, ostra, patologia, Perkinsiose, Apicomplexa, zoonose.

Introdução

Os moluscos bivalves são organismos amplamente distribuídos e com relevante interesse tanto para o cultivo como para a alimentação. Estes podem filtrar grande volume de água, tendo potencial para acumular, reter e concentrar substâncias químicas (TURECK et al., 2006) e biológicas (PEREIRA et al., 2006). Dentre os organismos que podem se associar aos bivalves, constam várias espécies de protozoários patogênicos ao molusco e outras ao humano, de veiculação hídrica e alimentar. Dentre os protozoários de interesse médico estão *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. (LEAL; FRANCO, 2008) que podem ser transmitidos por bivalves (SOUZA, 2014).

Perkinsus Levine, 1978 é um gênero de protistas do filo Perkinsozoa, cuja espécie-tipo é *Perkinsus marinus*, além de englobar outras seis espécies. Destas, *P. marinus* e *P. olseni* são de notificação obrigatória à Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE), por serem responsáveis por altas mortalidades em populações de moluscos (VILLALBA et al., 2011). Esse patógeno é amplamente estudado no Hemisfério Norte, onde afeta várias espécies de bivalves e também alguns gastrópodes, causando prejuízos a populações naturais e de cultivo (VILLALBA et al., 2011). Na América do Sul foi registrado pela primeira vez no Uruguai (CREMONTE et al., 2005) e depois no Brasil (SABRY et al., 2009). Quatro espécies já foram registradas no País e com exceção de um registro em *Anomalocardia brasiliiana* (FERREIRA et al., 2015), os demais referem-se a ocorrências em ostras do gênero *Crassostrea*, em que os estudos estão mais concentrados. Foram feitos registros de *P. marinus* em *C. rhizophorae* nos estados da Paraíba (DA SILVA et al., 2013), Bahia (PINTO et al., 2016) e Santa Catarina (DA CUNHA, 2016), de *P. olseni* em *C. gasar* na Paraíba (DA SILVA et al., 2014), de *P. beihaiensis* em *C. rhizophorae* no Ceará (SABRY et al., 2013), Bahia (LUZ; BOEHS, 2016) e Santa Catarina (DA CUNHA, 2016) e ainda de *P. chesapeaki* em *C. rhizophorae* no Ceará (DANTAS-NETO et al., 2016).

O nome da infecção causada por esse protozoário é Perkinsiose. Apesar de esta poder apresentar alta patogenicidade ao molusco, há apenas um estudo

experimental de efeitos em mamíferos, utilizando camundongos *Mus musculus*, feito nos Estados Unidos por Wijayalath et al. (2014), que realizaram infecção por curto período (7 dias) e inoculação via oral.

Protozoários do gênero *Nematopsis* Schneider, 1892 (Apicomplexa) são comumente relatados em várias espécies de bivalves de interesse econômico no mundo (LAUCKNER, 1983) e também são frequentes no Brasil, onde, aparentemente, não causam danos severos ou mortalidade nos moluscos (BOEHS et al., 2012). Em Portugal há um relato de mortalidade do bivalve *Cerastoderme edule* causado por este patógeno (AZEVEDO; CACHOLA, 1992). Apesar de alguns apicomplexos ocorrentes em moluscos apresentarem potencial zoonótico, não há estudos sobre possíveis efeitos deste protozoário sobre os mamíferos.

No litoral da Bahia ocorrem duas espécies nativas de ostras: *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) (Deshayes, 1830) (LUZ et al., capítulo 2, presente tese), sendo que ambas são comercializadas via extrativismo e a segunda é cultivada em alguns locais em sistema *longline* (espínhel) ou mesa (tabuleiro). Ambas as espécies são apreciadas como fonte de alimentação pelas comunidades produtoras, bem como em restaurantes e outros estabelecimentos comerciais da região.

Neste estudo objetivou-se, em uma prospecção zoonótica, verificar possíveis alterações morfológicas, macro e microscópicas, no camundongo Swiss (*Mus musculus*) infectado experimentalmente por *Perkinsus beihaiensis* e por *Nematopsis* sp., via inoculação utilizando *pools* da ostra *C. rhizophorae*.

Material e Métodos

Obtenção das amostras

Os exemplares da ostra *C. rhizophorae* foram coletados nas raízes de *Rhizophorae mangle* em um manguezal localizado na Baía de Camamu, Bahia (13°57'S, 39°02'W), nos meses de agosto e setembro de 2016. No local já havia sido confirmada a presença, tanto de *Perkinsus beihaiensis* (LUZ; BOEHS, 2016) quanto de *Nematopsis* sp. (LUZ e BOEHS, 2015). As ostras foram coletadas com o auxílio de uma faca e conduzidas semisubmersas em água do

mar em um balde até a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde foram processadas. A coleta foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, Brasil (Licença número 20912-3). Os camundongos Swiss foram obtidos a partir de recria no Biotério da UESC. O uso destes foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UESC (Concessão CEUA número 035/15).

Ensaio biológico

Um experimento piloto foi realizado inicialmente para determinar os tempos das observações. Antes da realização dos procedimentos experimentais e após a chegada de campo, as ostras foram mantidas em um aquário aerado durante 48 horas, sem alimentação, com o objetivo de aumentar as chances de transmissão horizontal do patógeno. Depois disso, 30 ostras foram trituradas e submetidas ao processo de digestão péptica, com adaptação da técnica proposta por Dubey et al. (1998). Completado esse processo, 1 mL do produto foi inoculado por via intraperitoneal em 21 camundongos com peso entre 25 e 35 g, dos quais oito receberam a solução tampão PBS (*Phosphate-buffered saline*), servindo de controle. Os camundongos foram eutanasiados após os seguintes intervalos: 4h, 24h, 48h, 72h, 5d, 7d, 10d e 15d.

Alterações macro e microscópicas foram evidenciadas no teste piloto com 15 dias. Dessa forma, para o experimento propriamente dito, utilizou-se intervalos de 15 (G1), 30 (G2) e 45 (G3) dias para a realização das eutanásias. Assim como para o ensaio piloto, fez-se a digestão péptica, para o qual foram utilizadas 45 ostras, cujo *pool* foi inoculado em três grupos de oito camundongos cada, dos quais seis foram inoculados com o produto da digestão e dois receberam PBS. A eutanásia foi feita por deslocamento cervical sem o uso de anestésicos para evitar aumento do baço e fígado. Constatando-se o óbito, foram realizados os seguintes procedimentos: (a) abertura dos animais e observação macroscópica dos órgãos quanto à presença de lesões ou outros sinais de infecção, que, quando presentes, eram registrados e fotografados; (b) retirada dos órgãos (com auxílio de bisturi e tesoura cirúrgica) e pesagem em balança digital

com 0,01 g de precisão; (c) obtenção de fragmentos de cérebro, pulmão, coração, fígado, baço, estômago, intestino (delgado e grosso) e rins, para procedimentos posteriores (histologia, cultura em RFTM e análises moleculares).

Durante todo o experimento, os camundongos foram visualmente monitorados quanto a possível ocorrência de sinais clínicos (alterações na frequência de alimentação, apatia, espasmos, etc.) indicativos de presença de enfermidade.

Histologia

Secções de aproximadamente 5 mm de cada órgão foram fixados em formaldeído a 10% por um período de 24 a 48 horas e depois processados por histotécnica convencional, incluindo desidratação em série alcoólica crescente, clareamento em xileno, inclusão em parafina e obtenção de cortes, por microtomia, de 3, 5 e 7 µm de espessura, cujos tecidos foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (H&E) (HOWARD et al., 2004) e posteriormente analisados em microscópio Olympus 30X. A prevalência parasitária foi calculada como a razão entre o número de camundongos infectados e o número total de camundongos analisados (BUSH et al., 1997). As lâminas foram depositadas no Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM/UESC), sob a responsabilidade do primeiro e do último autor.

Para classificar os tipos de lesões encontradas no fígado (órgão mais afetado), foi estabelecida a seguinte escala:

Grau 0 – Sem lesão;

Grau 1 – Infiltrado discreto focal a multifocal;

Grau 2 – Infiltrado discreto a moderado sem granuloma;

Grau 3 – Infiltrado moderado/granuloma focal;

Grau 4 – Infiltrado intenso e granuloma multifocal.

Cultivo em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM)

Uma secção de 8 mm de cada órgão foi retirada e incubada pela técnica de cultivo em Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM), seguindo protocolo

internacional (OIE, 2012), incluindo o acréscimo de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina) e antifúngico (Nistatina), para inibir a proliferação de microrganismos no meio de cultura. Conforme o protocolo, o meio de cultura foi mantido no escuro por 6-7 dias, a temperatura ambiente (20-25°C). Após esse período, os tecidos foram macerados e corados em solução de iodo a 3% para visualização em microscópio de luz. O RFTM permite a obtenção de hipnósporos, formas aumentadas de *Perkinsus* e facilmente visualizáveis e quantificáveis, o que possibilita a certificação da presença do patógeno na amostra. A intensidade de infecção foi calculada de acordo com a escala desenvolvida por Ray (1954) com adaptação, nos seguintes níveis (N): (a) Infecção nula: nenhum hipnósporo em toda a lâmina (100 x) (=N0); (b) Infecção muito baixa: menos de 10 hipnósporos em toda a lâmina (100 x) (=N1); (c) Infecção baixa: 11-100 hipnósporos em toda a lâmina (100 x) (=N2); (d) Infecção moderada: ao menos 40 hipnósporos observados em 10 diferentes campos (400 x) (=N3); (e) Infecção severa: mais de 40 hipnósporos observados em 11 diferentes campos (400 x) (=N4).

Procedimentos moleculares

Uma porção de 25mg de cada órgão (cérebro, pulmão, coração, fígado, baço, estômago, intestinos e rins) foi utilizada para a extração, utilizando o mini-kit Invitrogen®, seguindo instruções do fabricante. Para as reações da PCR, foi utilizado o par de *primers* PerkITS 85F (5'CCGCTTTGTTTGGATCCC) PerkITS-750R (5'ACATCAGGCCTTCTAATGATG 3') (CASAS et al., 2002), exclusivo para os membros do gênero *Perkinsus* (exceto para *P. qugwadi*). As reações da PCR foram realizadas em volume de 12,5 µl, contendo 100-200 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1x concentrado, MgCl₂ a 1,5 mM, nucleotídeos a 0,2 mM cada, *primers* a 0,8 µM e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. O DNA de *P. beihaiensis* identificado em estudo anterior (LUZ; BOEHS, 2016) foi utilizado como controle positivo. O protocolo incluiu desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de amplificação a 94°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 7

minutos. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,5%, corados com *Sybr Green*® e visualizados usando luz UV. O *amplicon* esperado para os iniciadores utilizados foi de 700pb.

Análise estatística

O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os peso do baço e do fígado dos animais inoculados e animais do controle, assim como entre os grupos experimentais. O nível de confiança adotado foi de 95% e os *softwares* utilizados para esse teste foram *Assistat 7.7pt* e *Origin 2017*. Para avaliar a associação dos níveis de lesão no fígado dos animais inoculados com o período dos grupos experimentais, foi utilizado o teste não paramétrico Qui-quadrado (χ^2), utilizando o programa estatístico R.

Resultados

Alterações morfológicas macroscópicas

As alterações macroscópicas observadas nos animais inoculados com *pool* de ostras com *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. foram: aumento de peso do baço e do fígado (**Figura 1a**), nódulos no fígado (em um animal do G1, dois animais do G2 e um do G3) e no intestino delgado de dois animais do G2, que continham aumento das placas de Peyer (**Figura 1b**) e uma fina membrana de fibrina cobrindo o fígado e o baço (**Figura 1b**). A maioria das alterações ocorreu concomitantemente. Os nódulos observados no fígado eram coesos, de cor branca a amarelo claro, medindo de 0,5 a 0,8 mm. Em um indivíduo do grupo G3 observou-se aumento de um dos rins. Os resultados de aumento de peso do baço e fígado e as prevalências de outros sinais macroscópicos estão apresentados na **Tabela 1**. Conforme mostra essa tabela, houve diferença significativa de peso entre os inoculados e não inoculados apenas do baço, tendo o peso do fígado sido semelhante entre esses grupos, o mesmo tendo ocorrido para os pesos do baço e do fígado quando comparados os animais inoculados dos três grupos (G1, G2 e G3).

Alterações microscópicas

Foram observadas infiltrações no fígado e no epitélio intestinal. De acordo com a escala proposta para a intensidade das lesões no fígado, foram observadas lesões de grau 1 com mais frequência no G1 (66,6%) e no G2 (50%) e com presença de grau 4 apenas nesses grupos. Em G3 foram identificados quatro animais com grau zero (0), um com grau 3 e outro com grau 4. O teste qui-quadrado indicou diferença estatística ($p = 0,001499$) no grupo G3 (45 dias), associando os níveis de lesões nesse grupo com o tempo amostrado. G1 e G2 não indicaram diferenças significativas em relação ao controle ($p= 0,2959$ e $p= 0,1974$, respectivamente).

Oocistos de *Nematopsis* sp. (Apicomplexa) foram observados no fígado associados a um infiltrado inflamatório granulamatoso nos animais dos grupos 1 (G1) e 2 (G2) (**Figura 2**).

Apesar das alterações macro e microscópicas, nenhum sinal clínico visível foi observado nos animais. Os resultados brutos podem ser vistos no Apêndice II.

Tabela 1. Resultados numéricos de peso do baço, fígado e rins (média e desvio padrão), comparações pelo teste Kruskal-Wallis (valores de p) de camundongos Swiss (*Mus musculus*) inoculados com produto de digestão péptica contendo *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. após 15, 30 e 45 dias e comparações, com as respectivas alterações macro e microscópicas em cada grupo e prevalências. I = inoculados; C = controle; n total = 24.

Grupos (G)	Peso do baço (g)		Peso do fígado (g)		Peso dos rins (g)		Alterações macroscópicas (I) e prevalência (%)
	I*	C**	I	C	I	C	
G1 (15 dias)	0,46±0,13	0,22±0,11	3±0,55	1,8±0,14	-----	-----	Membrana de fibrina no fígado (33,3) Nódulos no fígado (16,6) Placa de Peyer no intestino (33,3)
G2 (30 dias)	0,30±0,08	0,22±0,12	3,1±0,36	2,0±0,11	-----	-----	Membrana de fibrina no fígado e baço (16,6%) Nódulos no fígado (33,3%)
G3 (45 dias)	0,39±0,10	0,20±0,11	2,8±0,32	2,1±0,12	0,41±0,09	0,32±0,11	Nódulos no fígado (16,6%)
Comparação-I x C	p = 0,04		p = 0,05		-----		
Comparação-G1xG2xG3	p = 0,07		p = 0,18		-----		

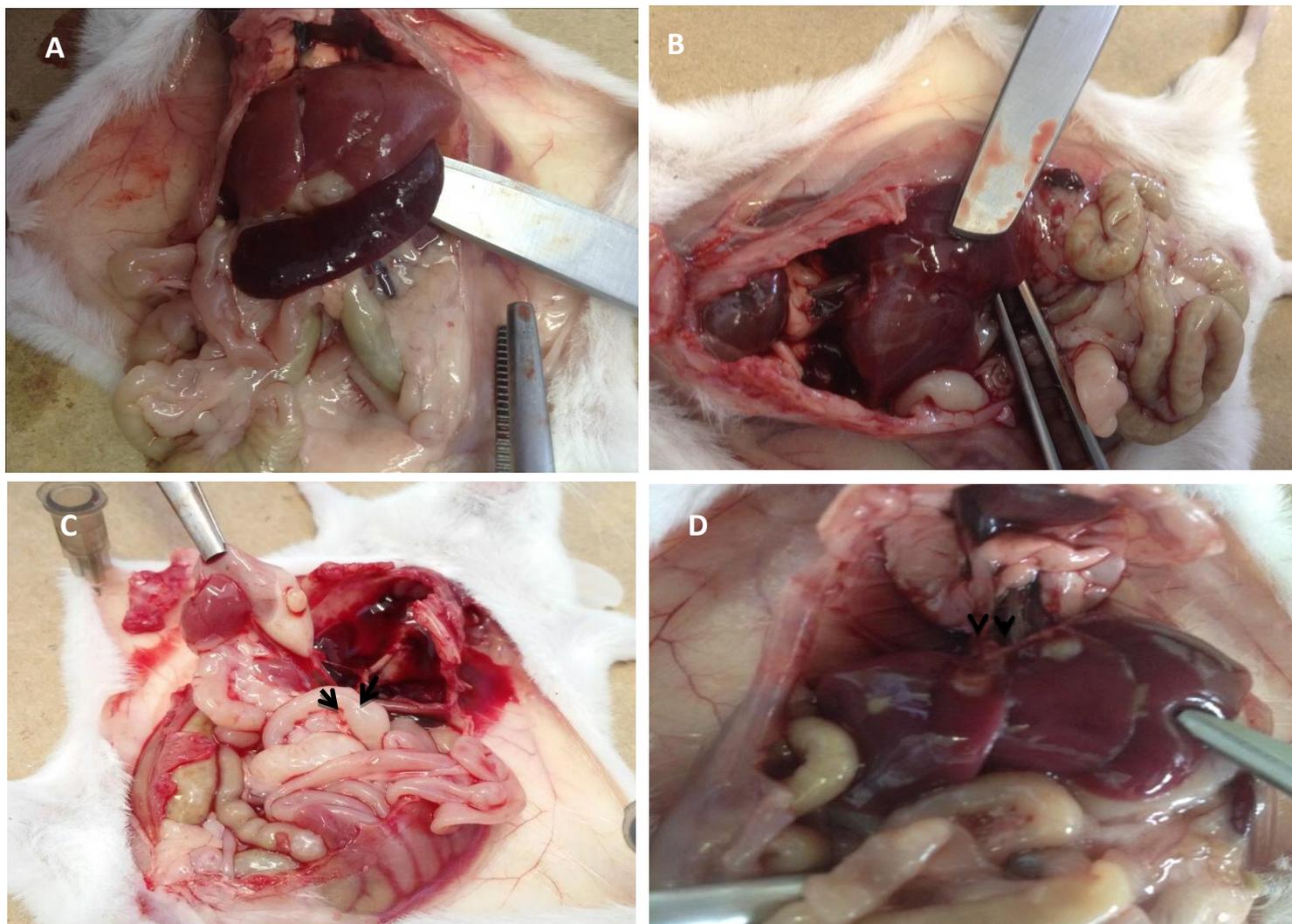


Figura 1. Alterações macroscópicas em camundongos Swiss (*Mus musculus*) infectados experimentalmente com *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp.. A) hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço); B) Presença de membrana fibrina sobre o fígado (cabeça de seta) e formação de pequenos nódulos (*); C) Nódulo no intestino (seta); D) Nódulos no fígado (cabeça de seta).

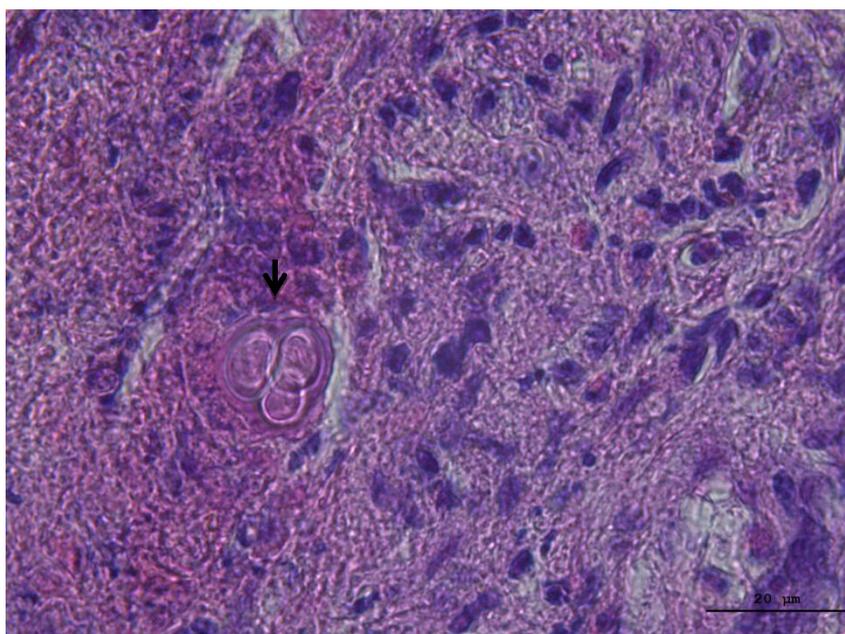


Figura 2. Oocistos de *Nematopsis* sp. (seta) no fígado de camundongo Swiss infectado experimentalmente. Aumento de 100X.

Os resultados do cultivo RFTM evidenciaram que apenas nos tubos com secções dos intestinos delgado e grosso (incluindo o reto) foram observados organismos assemelhados a *Perkinsus*. Os hipnósporos observados possuíam parede espessa, formato esférico e coloração marrom clara (**Figura 3**). O diâmetro dos hipnósporos variou entre 30 e 50 μm . A prevalência em animais com 15 e 30 dias de inoculado foi de 100%. Em camundongos com 45 dias de inoculados, apenas 33,3% (dois animais) apresentaram o patógeno. A intensidade de infecção variou de muito baixa (N1) a baixa (N2). Nenhuma das amostras foi positiva para *Perkinsus* spp. mediante o uso de ferramentas moleculares.

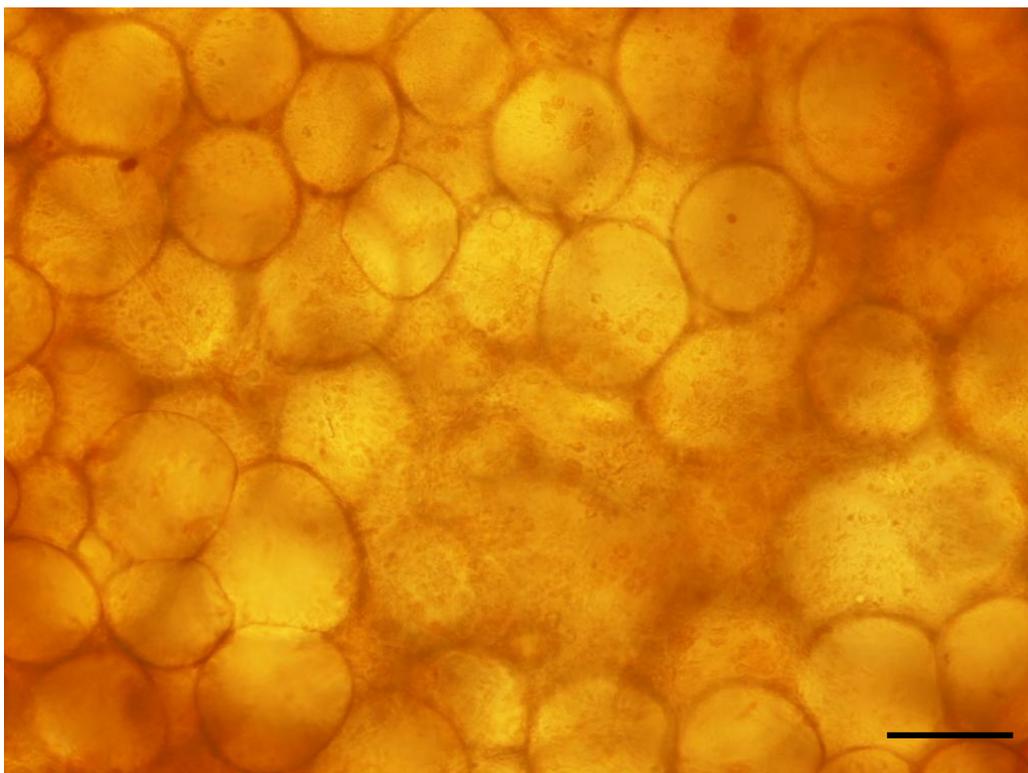


Figura 3. Hipnósporos no camundongo Swiss infectado experimentalmente com pool de ostras com *Perkinsus beihaiensis*. Barra= 25 μ m.

Discussão

O método de inoculação por via intraperitoneal permitiu a entrada e ação tanto de *Perkinsus beihaiensis* quanto de *Nematopsis* sp., indicando que esses protozoários possuem potencial de infecção e lesão em mamíferos.

Não há estudos de avaliação do potencial zoonótico de *Nematopsis* sp. Para *Perkinsus*, há apenas um relato (WIJAYALATH et al., 2014), cujo estudo consistiu em uma infecção experimental de *P. marinus* em *Mus musculus*, por via oral, com duração de sete dias de observação. Os animais não desenvolveram diarreia ou qualquer patologia detectável no trato gastrointestinal ou nos pulmões após alimentação única ou repetição. Segundo os autores, as populações de linfócitos no tecido linfoide associado ao intestino e baço permaneceram inalteradas nos camundongos alimentados com o parasito, excluindo a possibilidade de inflamação local ou sistêmica. Porém, o estudo demonstrou que mesmo sem causar lesão ou inflamação nos órgãos, houve estímulo de respostas imunes específicas, isto é, foram observadas IgM e IgG pré-existentes e que o seu

aumento foi bastante significativo após a administração do patógeno. No presente estudo, a alteração nos nódulos linfáticos no intestino (Placa de Peyer) de dois animais do G1 pode indicar uma resposta imune (humoral) à presença de *P. beihaiensis*. Uma outra questão é que os mencionados autores utilizaram o parasito vivo, após o que foi administrado por via oral, colocando o patógeno em contato direto com os sucos gástrico e entérico. No presente estudo, foi feita a digestão do tecido de modo análogo ao que ocorre no trato digestivo, o que poderia beneficiar a preservação das estruturas do protozoário, visto que o mesmo estaria em contato com os tecidos das ostras que também foram digeridos.

A presença de nódulos e de uma membrana no fígado e baço observados neste estudo corrobora uma observação feita em Portugal por Azevedo (1989) no bivalve *Ruditapes decussatus* infectado por *Perkinsus olseni*, em que este observou pústulas nas brânquias do bivalve nos casos mais graves. No presente estudo não foram observadas alterações no peritônio, nos órgãos internos ou bordas do fígado dos animais inoculados. Esse resultado indica que não houve peritonite causada pelas inoculações e que os sinais macroscópicos supracitados estão relacionados à presença dos parasitos, sendo a alteração no fígado associada possivelmente a *Nematopsis* sp.

A presença de hipnósporos de *P. beihaiensis* na porção final do intestino de camundongos inoculados pode indicar uma estratégia de sobrevivência do patógeno devido à disponibilidade de alimento nesse local, bem como uma forma de propagação e dispersão do mesmo pelas fezes. Em um estudo realizado na Coreia com *Ruditapes philippinarum*, Park et al. (2010) isolaram e identificaram *P. olseni* nas fezes desse bivalve, o que é mais um resultado indicativo de uma possível transmissão fecal deste protozoário. Em ostras do gênero *Crassostrea* do nordeste brasileiro, foi observada preferência de *Perkinsus* spp. pelo epitélio gástrico e intestinal (BRANDÃO et al., 2013; SABRY et al., 2013; LUZ; BOEHS, 2016). A coloração mais clara do hipnósporo observada no presente estudo, quando comparada à observada em bivalves, pode ser um indicativo que essa forma de vida (fase) do protozoário pode se apresentar de modo diferente nos mamíferos, visto que em invertebrados as substâncias e a dieta no intestino e reto são distintas.

As ostras utilizadas no experimento não apresentaram sinais macroscópicos como: abertura involuntária das valvas, coloração escura nas brânquias ou dos demais tecidos e palidez da glândula digestiva relatados em estudos anteriores da Perkinsiose (MARTINEZ; YEOMANS, 2001; VILLALBA et al., 2011). Os camundongos também não apresentaram sinais clínicos (apatia ou outras mudanças), o que pode indicar que *P. beihaiensis* e *Nematopsis* sp. se comportam de modo análogo no mamífero com o que ocorre em ostras, sendo a infecção, portanto, assintomática. Em um estudo realizado com a ostra *C. virginica* (VOLETY; CHU, 1995) foi observado que *P. marinus* libera substâncias químicas que inibem a ação dos hemócitos na ostra, de modo que sua presença não seja combatida de imediato pela defesa do hospedeiro.

No que se refere aos intervalos utilizados, as observações de alterações após 15 dias de inoculação indicam esse é o tempo suficiente para que os protozoários desenvolvam um ciclo e se adaptem, assim como para que o sistema imune dos camundongos identifique e combata os mesmos.

Os resultados negativos da PCR para *Perkinsus* possivelmente ocorreram em função da pequena quantidade de tecido analisado, assim como pequena carga parasitária. Outra possibilidade é que os nódulos do fígado (dos quais foram realizadas as extrações) tenham ocorrido em decorrência da presença de *Nematopsis* sp. e não de *P. beihaiensis*. Apesar de a descrição do gênero *Nematopsis* ter sido realizada há muitos anos, a taxonomia desse grupo se baseia no tamanho dos oocistos encontrados nos hospedeiros e em estudos ultraestruturais, não havendo menção na literatura de trabalhos com análises moleculares, motivo pelo qual não foi feita a análise genética da presença desse patógeno.

Nematopsis sp. utiliza os bivalves como hospedeiros intermediários, completando seu ciclo de vida no tubo digestório de crustáceos (LAUCKNER, 1983). A forma como ocorre a infecção nesses invertebrados não está elucidada, se é pela água ou pela alimentação de ostras com o parasito, mas em ambas as possibilidades os oocistos são uma forma resistente até a infecção do hospedeiro final (os crustáceos). *Toxoplasma gondii* é um protozoário do mesmo grupo, com oocisto de parede dupla, que confere alta resistência a fatores ambientais, podendo permanecer no ambiente por dias e até meses se houver condições favoráveis (DUBEY et al, 1998). Esse patógeno possui como

hospedeiro final os felídeos, mas pode infectar diversos hospedeiros não obrigatórios e acidentais como o homem (DUBEY et al., 1998). Este pode ser transmitido mediante rota fecal-oral por meio do contato direto de hospedeiro para hospedeiro, ou de maneira indireta, via água ou alimentos contaminados, após os oocistos serem ingeridos por hospedeiros susceptíveis (LEAL; FRANCO, 2008). Apesar de esse patógeno ser mais comum no humano e em animais domésticos, o mesmo pode se alojar nos tecidos de ostras provindas de locais contaminados (SOUZA, 2014).

Os camundongos nos quais foram observados *Nematopsis* sp. apresentaram uma membrana de fibrina no fígado. Microscopicamente, foi observado um infiltrado inflamatório, uma lesão tecidual provavelmente associada à presença desse parasito. Conforme DE SOUZA et al. (2018), a membrana de fibrina é rica em glicoproteínas e em fatores de crescimento. A sua presença sobre o fígado dos camundongos deste estudo pode indicar resposta imunológica frente à presença deste patógeno. O extravasamento desse tipo de membrana ocorre como um mecanismo de proteção para inibir a ação de agentes infecciosos que possam causar infecções mais graves, estando também associado a fatores de crescimento que melhoram a ação regeneradora (ALMEIDA et al., 2016) e a cicatrização tecidual (CHOUKROUN et al., 2006).

No presente estudo, nos camundongos inoculados com *P. beihaiensis* e *Nematopsis* sp. havia geralmente aumento concomitante do baço e do fígado. Em mamíferos, a esplenomegalia pode estar relacionada a infecções crônicas causadas por vírus, bactérias e doenças parasitárias, como observado por Albuquerque et al. (2002) em experimento realizado com coelhos inoculados com o apicomplexo *Toxoplasma gondii*.

Em conclusão este estudo permitiu concluir que:

(a) *Perkinsus beihaiensis* e *Nematopsis* sp. são viáveis, mesmo após digestão péptica, indicando que estes são resistentes a compostos estomacais e que provavelmente uma infecção oral, mediante ingestão de ostras (ou outros bivalves infectados por este patógeno), pode ser possível;

(b) As alterações patológicas observadas no camundongo sugerem um potencial zoonótico de ambos os patógenos e de indução de respostas pelo mamífero;

(c) Todos os resultados relacionados à presença de *Nematopsis* sp. indicam que houve o desenvolvimento de uma resposta crônica;

(d) A localização de *Perkinsus beihaiensis* no reto e porção final do intestino grosso de *M. musculus* é coincidente ao observado em ostras submetidas às análises do Meio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM);

(e) No camundongo, em condições experimentais, *Nematopsis* sp. e *Perkinsus beihaiensis* desenvolvem um ciclo inferior a 30 dias após o que ocorre uma diminuição da infecção;

(f) Os intervalos e o tipo de inoculação utilizados no presente estudo foram viáveis para a observação tanto de *P. beihaiensis* através da técnica de RFTM e de *Nematopsis* sp. em técnica histológica.

Agradecimentos

À FAPESB e a CAPES, órgãos de fomento brasileiros, pela concessão de bolsas de doutorado ao primeiro e segundo autores e à FAPESB pelo financiamento do projeto (TSC 0010/2011).

Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE, G.R.; SOUZA PINTO, A.R.; OLIVEIRA, F.C.R.; MUNHOZ, A.D.; LOPES, C.W.G. Lesions in rabbits due to *Toxoplasma gondii* Nicolle & Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, p. 27-31, 2002.

ALMEIDA, R.C.C.; BAIA, A.E.C.; DE SOUSA, A.C.S.; DUTRA, K.M.; LEMOS, M. V. S. **A aplicabilidade da membrana de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (I-prf) na odontologia: uma revisão de literatura.** Jornada odontológica dos acadêmicos da católica – joac, v. 2, n. 2, 2016.

AZEVEDO, C. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of clams, *Ruditapes decussatus*, from Portugal. **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 627-635, 1989.

AZEVEDO, C.; CACHOLA, R. Fine structure of the Apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve mollusks. *Dis. Aquat. Org.*, 14: 69-73, 1992

BOEHS, G.; MAGALHÃES, A.R.M.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O. Parasitos e patologias de bivalves marinhos de importância econômica da costa brasileira. In: SILVA-SOUZA, A. T.; LIZAMA, M.L.A.; TAKEMOTO, R. (org.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos, Maringá, Associação Brasileira de Patologistas de Organismos Aquáticos**. 1º ed. Maringá: Massoni, Cap. 8. p. 165-193. 2012.

BRANDÃO, R.P.; BOEHS, G.; SABRY, R.C.; CEUTA, L.O.; LUZ, M.S. A; QUEIROGA, F.R.; DA SILVA, P. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil., v. 112, p. 138-141, 2013.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575-583. 1997.

CASAS, S.M.; VILLALBA, A.; REECE, K.S. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 51-65, 2002.

CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M-O.; SCHOEFFLER, C.; DOHAN, S. L.; DOHAN, A.; MOUHYI, J.; DOHAN, D. M. Platelet-rich fibrin (PRF): Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v.101, 2006.

CREMONTE, F.; BALSEIRO, P.; FIGUERAS, A. Occurrence of *Perkinsus olseni* (Protozoa: Apicomplexa) and other parasites in the venerid commercial clam *Pitar*

rostrata from Uruguay, southwestern Atlantic coast. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, n. 1, p. 85-90, 2005.

DA CUNHA, A.C.L.B. 2016. **Diagnóstico de *Perkinsus* em ostras do litoral catarinense. Florianópolis, SC.** 61 p. (Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, UFSC).

DA SILVA, P.M.; VIANNA, R.T.; GUERTLER, C.; FERREIRA, L.P.; SANTANA, L.N.; FERNÁNDEZ-BOO, S.; RAMILO, A.; CAO, A.; VILLALBA, A. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil), **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 96-103, 2013.

DA SILVA, P.M.; SCARDUA, M.P.; VIANNA, R.T.; MENDONÇA, R.C.; VIEIRA, C.B.; DUNGAN, C.F.; SCOTT, G.P.; REECE, K.S. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 119, p. 62-71, 2014.

DANTAS-NETO, M.P.D.; GESTEIRA, T.C.V.; SABRY, R.C., FEIJÓ, R.G., FORTE, J.M., BOEHS, G., MAGGIONI, R., First record of *Perkinsus chesapeaki* infecting *Crassostrea rhizophorae* in South America, **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 141, nº 1, p. 53–56, 2016.

DE SOUZA, F.G.; FERNANDES, B.L.; REBELATTOA, C.L.K.; DE AGUIAR, A. M.; FRACAROA, L.; BROFMAN, P.R.S. Proliferação e diferenciação de células-tronco em contato com eluato de membrana de fibrina. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.53, p. 45-52, 2018.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites, and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**. v.11, p. 267–299, 1998.

FERREIRA, L.P.; SABRY, R.C.; DA SILVA, P.M, GESTEIRA, T.C.V.; ROMAO, L.S.; PAZ, M.P.; FEIJÓ, R.G.; DANTAS NETO, M.P.; MAGGIONI, R. First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 67-70, 2015.

HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. *Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans*. Massachusetts: Oxford. 218 p. NOAA Technical Memorandum. 2004.

LAUCKNER, G. **Diseases of Mollusca: Bivalvia**. In: KINNE, O. (ed). Diseases of marine animals. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. v. 2, 1983.

LEAL, D.A.G.; FRANCO, R.M.B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 10, p. 48-57, 2008.

LUZ, M.S.A; BOEHS, G. *Perkinsus beihaiensis* infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* under cultivation and in natural stock in Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 53, p. 191-198, 2016.

LUZ, M.S.A ; BOEHS, G. Parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* from farmed and natural stocks in the Bay of Camamu, Bahia, northeastern Brazil. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 7, p. 120-128, 2015.

MARTÍNEZ, J.C.; YEOMANS, R.V. **Manual de enfermedades de moluscos**. **Boletín Del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico**, v. 4, 2001.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH . **Manual of diagnostic test for aquatic animals**. Paris: OIE, 2012.

PARK, K.; YANG, H. S.; KANG, H. S.; CHO, M.; PARK, K. J.; CHOI, K.S. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 105, p. 261-269, 2010.

PEREIRA, M.A; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) produzidas e comercializadas na região litorânea de Florianópolis - Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 159-163, 2006.

PINTO, T.R.; BOEHS, G.; PESSOA, W.F.B.; LUZ, M.S. A; COSTA, H. Detection of *Perkinsus marinus* in the oyster *Crassostrea rhizophorae* in southern Bahia by proteomic analysis. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 53, p. 1-4, 2016.

RAY, S.M. Biological studies of *Dermocystidium marinum*, a fungus parasite of oysters. Houston: Rice Institute, 120 p. **Doctoral Thesis in Natural Sciences**, 1954.

SABRY, R.C.; GESTEIRA, T.C.V.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A.; GUERTLER, C.; FERREIRA, L.P.; VIANNA, R.T.; DA SILVA, P.M. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti river estuary, Ceará state, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, pp. 24-32, 2013.

SABRY, R.C.; ROSA, R.D.; MAGALHÃES, A.R.M.; BARRACCO, M.A.; GESTEIRA, T.C.V.; DA SILVA, P.M. First report of a *Perkinsus* sp. infecting Mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia: Ostreidae) at Jaguaribe River estuary - Ceará, Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, p. 13-23, 2009.

SOUZA, D.S.M. **Aquisição e eliminação de contaminantes em tecidos de moluscos bivalves**, f. 159. Tese de Doutorado Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

TURECK, C.D.; OLIVEIRA, T.M.N.; CREMER, M.J.; BASSFELD, J.C. Avaliação da concentração de metais pesados em tecido de ostras *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia) cultivadas na Baía da Babitonga, litoral Norte de Santa Catarina. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, p. 53 - 62, 2006.

VILLALBA, A.; GESTAL, C.; CASAS, S.M.; FIGUERAS, A. **Perkinsosis en moluscos**. In: Figueras, A., Novoa, B. (Eds.), Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, p. 181-242, 2011.

VOLETY, A.K.; CHU, F.L.E. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 135-142, 1995.

WIJAYALATH, W.; MAJJI, S.; KLESCHENKO, Y.; POW-SANG, L.; BRUMEANU, T.D.; VILLASANTE, E.F.; VASTA, G.R.; FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J.A.; Humanized HLA-DR4 mice fed with the protozoan pathogen of oysters *Perkinsus marinus* (Dermo) do not develop noticeable pathology but elicit systemic immunity. **Plos One**, v. 9, 2014.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do estudo permitem tecer as seguintes conclusões:

- Existem duas espécies de ostras do gênero *Crassostrea* no estado da Bahia: *Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar* (*C. brasiliiana*);
- Com exceção do tamanho, não foram observadas diferenças morfológicas entre as espécies de ostras;
- *Crassostrea gasar* apresenta tamanho geralmente maior em relação a *C. rhizophorae* e pode ser encontrada em níveis de maré mais baixos. Já *C. rhizophorae* foi encontrada em níveis mais altos das raízes dos mangues;
- As análises filogenéticas demonstraram que *C. brasiliiana* e *C. gasar* são a mesma espécie;
- Em todas as estações amostrais, houve apenas o registro de *Perkinsus beihaiensis*, sendo o epitélio digestivo o local mais frequente do parasito nas ostras;
- A prevalência de *P. beihaiensis* em ostras do gênero *Crassostrea* da Bahia é maior que em outros estudos realizados no Brasil e esse fato pode estar relacionado à salinidade, mas talvez também a outros fatores;
- Existe correlação positiva entre a salinidade e a prevalência e intensidade da infecção de *P. beihaiensis* nas ostras *Crassostrea* spp. da região;
- As diferenças ecológicas entre as duas espécies de ostras (*C. rhizophorae*, com hábitat em níveis entremarés ligeiramente mais altos aos de *C. gasar*) podem ter influência na susceptibilidade a *P. beihaiensis*;
- Alterações macro e microscópicas foram observadas em órgãos internos de camundongos Swiss infectados experimentalmente por *P. beihaiensis* e por *Nematopsis* sp.;
- O uso de bioensaio pode ser um protocolo viável para estudos de parasitos que ocorrem em ostras em modelos para humano;
- O uso de intervalos maiores no experimento evidenciou que *P. beihaiensis* requer maior tempo para causar alterações macroscópicas e microscópicas no camundongo Swiss;
- Tanto *P. beihaiensis* quanto *Nematopsis* sp. possuem potencial zoonótico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A costa da Bahia, assim como do Brasil, é bastante extensa com grande número de rios, áreas de manguezal e enseadas, que proporcionam relevante riqueza de seres vivos. Os moluscos bivalves são animais bem adaptados às áreas costeiras e de manguezais, ocorrendo em diversos ambientes, sendo utilizados tanto como produto para alimentação como para comercialização. Conhecer as espécies existentes em determinadas regiões com características para o cultivo, é um dos aspectos que contribuem para o sucesso do manejo e produção em maiores escalas. Os resultados observados neste estudo indicaram que há ocorrência de duas espécies de ostras no litoral da Bahia (*Crassostrea rhizophorae* e *C. gasar*), sendo *C. gasar* de maior tamanho, ocorrendo em regiões entremarés mais baixas e de infralitoral, enquanto *C. rhizophorae* pode ser observada principalmente nas raízes do mangue.

Uma vez conhecidas as espécies de ostras e os seus locais de ocorrência, foi então possível constatar a ocorrência de *Perkinsus beihaiensis* no litoral Sul da Bahia. O protozoário foi observado em ambas as espécies de ostras, tendo sido a prevalência e os níveis de infecção correlacionados à salinidade.

Após a identificação do patógeno, foi realizado uma avaliação, por infecção experimental em camundongo Swiss (*Mus musculus*), do potencial zoonótico de *P. beihaiensis* e de *Nematopsis* sp. Foi constatado que intervalos de tempo de 15, 30 e 45 dias são eficientes para observação de respostas crônicas do modelo utilizado. Nesse estudo foi possível verificar que ambos os parasitos inoculados foram resistentes à digestão péptica, causando resposta do sistema imunológico. *Perkinsus beihaiensis* possivelmente causou alterações nos nódulos linfoides do intestino delgado (Placa de Peyer). Já *Nematopsis* sp. foi associado ao aumento do baço e do fígado, assim como à formação de uma membrana de fibrina sobre o fígado e ainda à formação de nódulos sobre este. Todas as análises indicam que houve desenvolvimento de uma infecção crônica por este protozoário.

Essa é a primeira infecção experimental de *P. beihaiensis* e de *Nematopsis* sp. em camundongos Swiss. O estudo permite afirmar que é possível observar parasitos ocorrentes em ostras em modelo de mamífero, sendo uma ferramenta eficiente para

novas investigações e que pode ser um meio para elucidar como infecções alimentares causadas por ostras podem acometer o humano.

APÊNDICES



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 035/15**, relativo ao projeto intitulado **Identificação, morfologia e efeitos histopatológicos do protozoário Perkinsus (Perkinsozoa) na ostra Crassostrea rhizophorae e no camundongo Mus musculus**, da **Dra. Guisla Boehs**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UESC)**. Este Protocolo foi aprovado dia 01/02/2016. Este certificado é válido por 01 (um) ano, a partir da data de sua emissão.

Ilhéus, 01 de fevereiro de 2016.

Prof. Guilherme Rosenberg G. Queiroz
Presidente do CEUA-UESC
Céd.: 73.333.462-1

HISTOLOGIA – PERKINSUS

3.8 A

Pulmão: Infiltrado linfocitário intersticial multifocal discreto associado a hemorragia intraalveolar e intersticial multifocal moderada com macrófagos apresentando pigmento amarronzado intracitoplasmático multifocal moderado (hemossiderina).

Rim: Infiltrado inflamatório linfocitário focal discreto.

3.8 B

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

3.8 C

Intestino delgado (jejuno e íleo): Sem alteração histológica significativa.

Estômago: Sem alteração histológica significativa

3.7 A

Encéfalo (cérebro e cerebelo): Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Infiltrado linfocitário intersticial multifocal peribronquiolar discreto associado a hemorragia intra-alveolar multifocal discreta com macrófagos apresentando pigmento amarronzado intracitoplasmático multifocal moderado (hemossiderina).

3.7 B

Rim: Sem alteração histológica significativa

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Fígado: Área focalmente extensa de fibroplasia circundada por infiltrado inflamatório linfocitário moderado e célula gigante multinucleada (??). Infiltrado inflamatório linfocitário periportal multifocal discreto a moderado.

3.7 C

Intestino delgado (jejuno e íleo): Sem alteração histológica significativa.

3.6 A

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Infiltrado linfocitário intersticial multifocal discreto associado a hemorragia intra-alveolar multifocal discreta com macrófagos apresentando pigmento amarronzado intracitoplasmático multifocal moderado (hemossiderina).

Rim: Sem alteração histológica significativa

3.6 B

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocitário aleatório multifocal moderado.

3.6 C

Intestino delgado (jejuno e íleo): Sem alteração histológica significativa.

3.5 A

Encéfalo (cérebro): Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Infiltrado linfocitário intersticial multifocal discreto.

Rim: Sem alteração histológica significativa

3.5 B

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Fígado: Sem alteração histológica significativa

3.5 C

Intestino delgado (jejuno e ileo): Presença de parasitas intraluminais no jejuno com grandes dimensões, alongado e apresentando revestimento externo pregueado.

3.4 A

Encéfalo (cérebro): Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Sem alteração histológica significativa

3.4 B

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Rim: Não foi possível avaliar histologicamente.

Fígado: Sem alteração histológica significativa

3.4 C

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa

Estômago: Sem alteração histológica significativa

3.3 A

Fígado: Sem alteração histológica significativa

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

3.3 B

Pulmão: Macrófagos intersticiais apresentando pigmento amarronzado intracitoplasmático multifocal moderado (hemossiderina).

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

Estômago (porção aglandular): sem alteração histológica significativa

Coração: Sem alteração histológica significativa

3.3 C

Intestino delgado (jejuno e íleo): Sem alteração histológica significativa

3.1 A

Rim: Sem alteração histológica significativa

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

3.1 B

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Pulmão: Macrófagos intersticiais apresentando pigmento amarronzado intracitoplasmático multifocal discreto (hemossiderina).

Fígado: Sem alteração histológica significativa

3.1 C Lamina com artefato

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa

Intestino grosso: Sem alteração histológica significativa

Estômago: Sem alteração histológica significativa

2.8 A

Pulmão: Macrófagos intersticiais apresentando pigmento amarronzado intracitoplasmático multifocal discreto (hemossiderina).

Rim: Sem alteração histológica significativa

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

2.8 B

Cérebro e cerebelo: Sem alteração histológica significativa

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico aleatório multifocal intenso associado a degeneração de hepatócitos multifocal a coalescente moderada.

2.8 C Lamina com artefato

Intestino delgado (jejuno): Não foi possível avaliar histologicamente. Lâmina com muito artefato.

Estômago: Infiltrado inflamatório linfocítico multifocal discreto na mucosa.

2.7 A

Coração: Sem alteração histológica significativa

Rim: Sem alteração histológica significativa

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico intersticial multifocal discreto e hemorragia intraalveolar focalmente extensa moderada associado a macrófagos com pigmento amarronzado (hemossiderina) discreto.

2.7 B

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico aleatório multifocal discreto.

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

2.7 C

Intestino delgado (íleo e jejuno): Sem alteração histológica significativa

Estômago: Sem alteração histológica significativa

2.6 A

Coração: Sem alteração histológica significativa

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico intersticial multifocal discreto associado a macrófagos com pigmento amarronzado (hemossiderina) discreto multifocal.

2.6 B

Rim: Sem alteração histológica significativa

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa

2.6 C

Intestino delgado (íleo e jejuno): Sem alteração histológica significativa

Estômago: Sem alteração histológica significativa

2.5 A

Rim: Sem alteração histológica significativa

Coração: Sem alteração histológica significativa

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Encéfalo (Cérebro e cerebelo): Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Macrófagos com pigmento amarronzado (hemossiderina) discreto multifocal no interstício.

2.5 B

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocítico aleatório multifocal discreto.

2.5 C

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa

Estômago: Sem alteração histológica significativa

2.4 A

Coração: Sem alteração histológica significativa

Encéfalo (Cérebro e cerebelo): Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Hiperemia difusa intensa associada a hemorragia intra-alveolar multifocal moderada, macrófagos intersticiais com pigmento amarronzado (hemossiderina) difuso intenso.

2.4 B

Baço: Sem alteração histológica significativa

Rim: Sem alteração histológica significativa

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocítico aleatório multifocal discreto.

2.4 C

Intestino delgado (jejuno e ileo): Sem alteração histológica significativa

Estômago: Sem alteração histológica significativa

2.3 A

Coração: Sem alteração histológica significativa

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Macrófagos intersticiais com pigmento amarronzado (hemossiderina) multifocal discreto.

2.3 B

Rim: Sem alteração histológica significativa

Fígado: Sem alteração histológica significativa

2.3 C

Intestino delgado (jejuno e ileo): Sem alteração histológica significativa

Estômago: Sem alteração histológica significativa

2.2 A

Fígado: Área focalmente extensa de necrose de liquefação circundada por infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico intenso, com fibroplasia, células gigantes e estruturas circulares com 30 a 40 micrometros de diâmetro, parede espessa, intralesional. Áreas multifocais aleatórias com infiltrado linfocitário discreto.

Coração: Área focalmente extensa de fibroplasia associado a infiltrado inflamatório linfocitário intenso, hemorragia moderada e perda e degeneração de cardiomiócitos.

Pulmão: Infiltrado inflamatório linfocitário intersticial multifocal a coalescente discreto.

2.2 B

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Coração: Sem alteração histológica significativa

Encéfalo (cérebro e cerebelo): Sem alteração histológica significativa

2.2 C

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa. (autólise superficial).

Estômago: Sem alteração histológica significativa

2.1 A

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa

Coração: Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Sem alteração histológica significativa

2.1 B

Encéfalo (cérebro e cerebelo): Sem alteração histológica significativa

Fígado: Sem alteração histológica significativa (pouco fragmento)

2.1 C Muito artefato

Intestino delgado (jejuno e ileo): Sem alteração histológica significativa. (autólise superficial)

1.8 A

Rim: Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Macrófagos intersticiais com pigmento amarronzado (hemossiderina) multifocal discreto.

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

Coração: Sem alteração histológica significativa

1.8 B

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico multifocal aleatório discreto a moderado.

Intestino delgado: Sem alteração histológica significativa. Tecido autolisado.

1.8 C

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa.

Estômago: Sem alteração histológica.

1.7 A

Rim: Sem alteração histológica significativa

Pulmão: Macrófagos intersticiais com pigmento amarronzado (hemossiderina) multifocal discreto.

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

1.7 B

Fígado: Área focalmente extensa de necrose de liquefação circundada por infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico moderado, com fibroplasia e estruturas circulares com 30 a 40 micrometros de diâmetro, parede espessa, intralésional. Áreas multifocais aleatórias com infiltrado linfocitário neutrofílico moderado.

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

1.7 C

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa.

1.6 A

Rim: Sem alteração histológica significativa

Coração: Sem alteração histológica significativa

Cérebro: Sem alteração histológica significativa

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocitário periportal multifocal discreto.

1.6 B

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocitário periportal multifocal discreto.

1.6 C

Intestino delgado (jejuno e íleo): Sem alteração histológica significativa.

1.5 A

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico aleatório multifocal a coalescente intenso com fibroplasia discreta e circundando áreas multifocais com degeneração e necrose de hepatócitos.

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

1.5 B

Rim: Sem alteração histológica significativa.

Coração: Sem alteração histológica significativa.

Cérebro: Sem alteração histológica significativa.

1.5 C

Intestino delgado (jejuno): área folcamente extensa na submucosa e musculatura apresentando infiltrado inflamatório linfocitário neutrofílico intenso circundando uma área de necrose de liquefação que apresenta no seu interior colônias bacterianas e fragmentos de corpo estranho eosinofílico alongado.

Intestino grosso: Sem alteração histológica significativa.

1.4 A

Rim: Área focal de infiltrado inflamatório linfocítico moderado na medular.

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

1.4 B

Fígado: Infiltrado linfocitário aleatório multifocal discreto.

Cérebro: Sem alteração histológica significativa.

1.4 C

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa.

Estômago: Sem alteração histológica significativa.

1.3 A

Rim: Sem alteração histológica significativa.

Coração: Sem alteração histológica significativa.

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

Fígado: Sem alteração histológica significativa.

1.3 B

Fígado: Sem alteração histológica significativa.

Cérebro: Sem alteração histológica significativa.

Pulmão: Macrófagos intersticiais com pigmento amarronzado (hemossiderina) multifocal moderado.

1.3 C

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa.

Estômago: Sem alteração histológica significativa.

1.2 A

Rim: Sem alteração histológica significativa.

Encéfalo (cérebro e cerebelo): Sem alteração histológica significativa.

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

1.2 B

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocítico neutrofílico multifocal discreto.

Pulmão: Infiltrado inflamatório linfocitário peribronquiolar multifocal discreto e macrófagos intersticiais com pigmento amarronzado (hemossiderina) multifocal moderado.

1.2 C

Intestino delgado (jejuno): Sem alteração histológica significativa.

Estômago: Sem alteração histológica significativa. Pouco fragmento.

Intestino grosso: Sem alteração histológica significativa. Muito artefato.

1.1 A

Rim: Sem alteração histológica significativa.

Pulmão: Muito artefato. Não foi possível avaliar histologicamente.

Fígado: Infiltrado inflamatório linfocítico multifocal discreto.

1.1 B

Coração: Sem alteração histológica significativa.

Encéfalo (cérebro e cerebelo): Sem alteração histológica significativa.

Baço: Não foi possível avaliar histologicamente.

1.1 C

Intestino delgado (jejuno e ileo): Sem alteração histológica significativa.

Estômago: Sem alteração histológica significativa.

ANEXOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ESCOPO DA REVISTA

O **BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA**, ISSN 0046-9939 (impresso) e ISSN 1678-2305

(*online*), tem por objetivo a divulgação de trabalhos científicos inéditos, relacionados a Pesca, Aquicultura e Limnologia.

Política Editorial

A política da Instituição para o Boletim do Instituto de Pesca inclui a publicação de artigos científicos, notas científicas, relatos de caso e artigos de revisão, originais, que contribuam significativamente para o conhecimento nas áreas de Zootecnia, Limnologia, Biologia e Pesca. A publicação dos trabalhos depende da aprovação do Conselho Editorial, baseada em revisão por pares.

Informações gerais sobre o Boletim

É publicado um volume por ano, com o necessário número de fascículos. Os trabalhos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol.

O processo de avaliação utilizado pelo *Comitê Editorial do Instituto de Pesca* é o sistema por pares “blind review”, ou seja, sigilo sobre a identidade, tanto dos autores quanto dos revisores.

O original do trabalho (uma cópia impressa e uma cópia gravada em CD ROM), bem como dos documentos necessários (relacionados no item *Submissão de trabalho*), devem ser encaminhados ao Comitê Editorial, via correio, sendo todos os trâmites necessários para avaliação e publicação realizados via e-mail.

Após a publicação da edição impressa, o autor responsável pelo trabalho receberá 19 (dezenove) separatas.

Os trabalhos enviados para publicação no *Boletim do Instituto de Pesca* podem ter a forma de **Artigo Científico**, **Nota Científica**, **Relato de Caso** ou **Artigo de Revisão**. O(s) autor(es) deve(m) indicar, no ofício de encaminhamento, que tipo de trabalho desejam seja publicado. Entretanto, **após avaliação do original, os revisores e/ou editores podem propor que o mesmo seja publicado sob outra forma, se assim julgarem pertinente.**

Em todos os casos, os dados constantes do trabalho **não podem ter sido publicados, exceto na forma preliminar, como resumo, dissertação, tese ou parte de palestra publicada.**

Tipos de publicação

Artigo Científico

Trabalho resultante de pesquisa científica, **apresentando dados originais**, obtidos por meio de experimentação e/ou teoria, baseada em métodos consagrados e com planejamento estatístico adequado e discussão criteriosa, com base científica sólida.

Nota Científica

Comunicação curta de fato inédito resultante de pesquisa científica, cuja divulgação imediata se justifica, mas com informações insuficientes para constituir artigo científico. Incluem-se nesta categoria a descrição de uma técnica, o registro da descoberta de uma nova espécie biológica, observações e levantamentos de resultados de experimentos que não podem ser repetidos, e outras situações únicas. Deve ter o mesmo rigor científico de um Artigo Científico e conter os elementos necessários para avaliação dos argumentos apresentados.

Relato de Caso

Trabalho constituído de dados descritivos ou observacionais de um ou mais casos, explorando um método ou problema por meio de um exemplo investigado.

Artigo de Revisão

Estudo aprofundado sobre tema específico ou questão que requer amplo debate interdisciplinar. Não deve consistir apenas de um resumo de dados, mas conter também uma avaliação crítica e objetiva dos dados, o estado da arte e a investigação necessária para o avanço do conhecimento sobre o tema.

PROCEDIMENTOS EDITORIAIS

Submissão de trabalho

Os trabalhos deverão ser enviados, **via correio**, com a seguinte documentação **devidamente assinada**:

1. Ofício de encaminhamento do trabalho ao Comitê Editorial do Instituto de Pesca, contendo **título do artigo, nome completo do(s) autor(es), seus endereços institucionais e e-mails**, bem como o **nome do autor indicado para correspondência** e a especificação do **tipo de publicação** (Artigo Científico, Nota Científica, Relato de Caso ou Artigo de Revisão) (modelo no link **Documentos**, no site: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>);
2. Original do trabalho: uma cópia impressa (rubricada) e uma cópia gravada em CD-ROM,

devidamente identificado;

3. Quando necessário, atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição de origem da pesquisa.

Endereço:

Comitê Editorial do Instituto de Pesca

CAIXA POSTAL 61070 – CEP: 05001-970 - São Paulo – SP - Brasil Tel.:

(11) 3871-7535

site: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>

O trabalho **também** deverá ser enviado, devidamente identificado, **via e-mail**, para: ceip@pesca.sp.gov.br .

Os trâmites para publicação só serão iniciados após o recebimento dos documentos via correio.

Após **aprovação** do trabalho, deverá ser encaminhada:

1. Cessão de Direitos Autorais e Autorização para publicação em meio eletrônico (modelo no link **Documentos**, no site: <http://www.pesca.sp.gov.br/siteOficialBoletim.php>). O documento deve ser assinado pelo(s) **autor(es)**. Excepcionalmente, na impossibilidade de obter a assinatura de algum dos autores, o autor responsável pelo trabalho deve assumir a responsabilidade pelas declarações.

Avaliação do trabalho

1. O trabalho, submetido ao *Boletim*, que atender à política Editorial, às normas para submissão e às normas de estruturação do texto (formatação) será pré-selecionado para avaliação linguística (*) e técnica. Caso contrário, será solicitada a adequação às normas ou a inclusão de documentos, para que a tramitação do mesmo se inicie.

(*) Recomenda-se que o(s) autor(es) busque(m) assessoria linguística profissional (revisores e/ou tradutores certificados em língua portuguesa e/ou inglesa e/ou espanhola) antes de encaminhar o trabalho para publicação.

2. Original de trabalho com inadequações linguísticas, morfológicas ou sintáticas, que por isso exigir revisão criteriosa, poderá ser recusado pelo Comitê Editorial.

3. Após aprovação pelo CEIP, e segundo a ordem cronológica de recebimento, o trabalho é enviado a revisores (no mínimo dois) de reconhecida competência no assunto abordado. Em seguida, se

necessário, retornará ao(s) autor(es) para modificações/correções. O retorno do texto manuscrito poderá ocorrer mais de uma vez, se assim o(s) revisor(es) solicitar(em).

O prazo de retorno do trabalho corrigido pelo(s) autor(es) ao CEIP, cada vez que solicitado, será de até 30 (trinta) dias; caso o prazo não seja obedecido, o processo será automaticamente cancelado.

4. O trabalho será aceito para publicação se tiver dois pareceres favoráveis, ou rejeitado quando pelo menos dois pareceres forem desfavoráveis. No caso de pareceres contraditórios, o trabalho será enviado a um terceiro revisor.

Ao Comitê Editorial é reservado o direito de efetuar os ajustes que julgar necessários.

5. Os originais não aceitos para publicação ficarão à disposição do(s) autor(es) por um ano (12 meses).

6. O trabalho aceito retornará ao(s) autor(es) para eventuais alterações e checagem (versão preliminar), necessárias no processo de editoração e normatização ao estilo do Boletim. O prazo para devolução será de sete (7) dias.

Disposições finais

Casos omissos serão avaliados pelo Comitê.

ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO - Formatação

Instruções gerais

O trabalho deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word (arquivo “doc”), de acordo com a seguinte formatação:

- fonte Book Antiqua, tamanho 11;
- espaçamento entre linhas: 1,5;
- tamanho da página: A4;
- margens esquerda e direita: 2,5 cm;
- margens superior e inferior: 3,0 cm;
- número máximo de páginas, incluindo Figura(s) e/ou Tabela(s) e Referências:
 - . Artigo Científico e Artigo de Revisão: 25 páginas;
 - . Nota Científica: 15 páginas;
 - . Relato de Caso: 15 páginas.
- as **linhas devem ser numeradas sequencialmente, da primeira à última página**. As páginas

também devem ser numeradas. Estrutura de Artigo Científico

A estrutura de Artigo Científico é a seguinte: Título, Autor(es), Endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (opcional), Referências.

O Título, o Resumo e as Palavras-chave devem ser traduzidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português ou espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês ou espanhol.

Os termos: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão(ões), Agradecimentos e Referências devem ser alinhados à esquerda e grafados em letras maiúsculas e em negrito.

TÍTULO

Deve ser claro e conciso, redigido em português e inglês ou, se for o caso, em espanhol, inglês e português. Deve ser grafado em letras maiúsculas e centralizado na página. No caso de trabalho desenvolvido com auxílio financeiro, informar qual a Agência, na primeira página, indicada com asterisco, também apostro ao final do título. Recomenda-se não colocar nome de descritor de espécie biológica, a não ser que seja imprescindível. **Evitar títulos longos.**

NOME(S) DO(S) AUTOR(ES)

Deve(m) ser apresentado(s) completo(s) e na ordem direta (prenome e sobrenome). Redigir em caixa alta apenas o sobrenome pelo qual o(s) autor(es) deve(m) ser identificado(s). A filiação do(s) autor(es), bem como o endereço completo para correspondência e o e-mail, deverão ser colocados na primeira página, logo após o nome dos autores, sendo identificado(s) por números arábicos, separados por vírgula quando necessário.

O número **máximo de autores** deverá ser de **seis (6)**, no caso de Artigos Científicos, e **quatro (4)**, no caso de Nota Científica e Relato de Caso. Serão aceitos mais autores, desde que justificada a atuação de todos na execução/elaboração do trabalho. Caberá ao CEIP verificar a pertinência da justificativa.

RESUMO + Palavras-chave

Obrigatório em qualquer tipo de trabalho. O Resumo deve conter concisamente o objetivo, a metodologia, os resultados obtidos e a conclusão, em um número máximo de palavras de **250** (duzentas e cinquenta) para **Artigos Científicos** e **150** (cento e cinquenta) para **Notas Científicas e Relatos de Caso**.

- **palavras-chave**: no máximo seis (6) e mínimo de três (3), redigidas em letras minúsculas e separadas por ponto e vírgula. **Não devem repetir palavras que constem do Título**.

ABSTRACT + Key words

Devem ser estritamente fiéis ao Resumo e Palavras-chave.

INTRODUÇÃO

Deve ocupar, preferencialmente, no máximo duas páginas. Deve apresentar o problema científico a ser solucionado e sua importância (justificativa para a realização do trabalho), e estabelecer sua relação com resultados de trabalhos publicados sobre o assunto. O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o constante no Resumo.

MATERIAL E MÉTODOS

As informações devem ser organizadas de preferência em ordem cronológica e descrever sucintamente a metodologia aplicada, de modo que o experimento possa ser reproduzido.

Deve conter, de acordo com a natureza temático-científica, a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, a descrição dos tratamentos e das variáveis, o número de repetições e as características da unidade experimental.

Deve-se evitar detalhes supérfluos, extensas descrições de técnicas de uso corrente e a utilização de abreviaturas não usuais.

Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.

Evitar o uso de subtítulo, mas, quando indispensável, grafá-lo em itálico, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

RESULTADOS

Podem ser apresentados sob a forma de Tabelas e/ou Figuras, quando necessário. Dados apresentados em Tabelas ou Figuras não devem ser repetidos sistematicamente no texto.

Tabelas: devem ser numeradas com algarismos arábicos e encabeçadas pela legenda (autoexplicativa); recomenda-se que os dados apresentados em tabelas não sejam repetidos em gráfico, a não ser quando absolutamente necessário. As Tabelas devem ter, **no máximo,**

16 cm de largura. Deve-se evitar, sempre que possível, tabela em formato paisagem. Abreviaturas também devem ser evitadas, a não ser quando constituírem unidades de medida. As **Tabelas devem ser enviadas em word** (não transformá-las em “Figuras”). **Figuras:** representadas por gráficos, desenhos, mapas ou fotografias, devem ter, **no máximo, 16 cm de largura e 21 cm de altura.** Devem ser numeradas com algarismos arábicos, com título autoexplicativo abaixo delas. Gráficos e mapas devem ser apresentados em fontes legíveis. Recomenda-se **não** inserir gráficos, mapas ou fotos em tabelas ou quadros.

Tabelas e Figuras devem ser inseridas no decorrer do texto. Desenhos, mapas e fotografias devem ser apresentados no original e em arquivos distintos, preferencialmente em formato digital “tif” ou “jpeg”, Ex.: *figura x.tif* ou *figura x.jpeg*, e permitir redução para 16 cm ou 7,5 cm de largura, **sem perda de definição.** Figuras coloridas poderão ser incluídas somente quando estritamente necessário.

DISCUSSÃO

A Discussão deve ser elaborada e não apenas uma comparação dos dados obtidos com os observados na literatura. Evitar repetir valores numéricos, constantes dos resultados, assim como citar Tabelas e Figuras. A Discussão deve conter comentários adequados e objetivos dos resultados, discutidos à luz de observações registradas na literatura.

CONCLUSÕES

As Conclusões devem ser claras, concisas e responder ao(s) objetivo(s) do estudo.

AGRADECIMENTOS (opcional)

Devem ser sucintos, dirigidos a Instituição(s) ou pessoa(s) que tenha(m) prestado colaboração para a realização do trabalho, e, de preferência, não ultrapassar cinco linhas.

Estrutura de Nota Científica e Relato de Caso

Nota Científica e Relato de Caso devem seguir ordenação similar à de Artigo Científico, contendo Título, Autor(es), Endereços institucional(s) e eletrônico(s), Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Agradecimentos (opcional) e Referências.

A formatação segue o mesmo padrão, com exceção do número máximo de palavras no resumo (**150 palavras**) e número máximo de páginas (incluindo Tabelas e Figuras): **15 páginas**.

Estrutura de Artigo de Revisão

Por se tratar de um artigo diferenciado, não é obrigatório seguir a mesma ordenação aplicada aos demais tipos de artigos. Entretanto, deve conter: Título, Autor(s), Endereço(s) Institucional(s) e eletrônico(s), Resumo, Palavras-chave, Título em inglês, Abstract, Key words, Introdução, Discussão, Agradecimentos (opcional) e Referências.

REFERÊNCIAS (normas para TODOS os tipos de publicação)

São apresentadas em ordem alfabética do sobrenome dos autores, sem numeração. Devem conter os nomes de todos os autores da obra, a data de publicação, o nome do artigo e do periódico, por extenso, local da publicação (**SEMPRE** que possível), volume e/ou edição e número/intervalo de páginas.

A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e citados no texto são de responsabilidade do autor.

Trabalhos de conclusão de curso (TCC) ou monografias não serão aceitos como referências.

Dissertações, teses e resumos devem ser evitados como referências. Se for imprescindível sua citação, indicar a URL (endereço na Internet).

Exemplos:

Citações no texto

- Usar o sistema Autor/Data, ou seja, o sobrenome do(s) autor(s) (em letras **maiúsculas**) e do ano em que a obra foi publicada. Exemplos:

- para um autor: "MIGHELL (1975) observou..."; "Segundo AZEVEDO (1965), a

piracema...”; “Estas afirmações foram confirmadas em trabalhos posteriores (WAKAMATSU, 1973)”.

- para dois autores: “RICHTER e EFANOV (1976), pesquisando...” Se o trabalho que está sendo **submetido** (ou seja o SEU trabalho) estiver **redigido** em português usar “e” ligando os sobrenomes dos autores. Se estiver redigido em inglês ou espanhol usar “and” (RICHTER and EFANOV, 1976) ou “y” (RICHTER y EFANOV, 1976), respectivamente.

- para três ou mais autores: o sobrenome do primeiro autor deve ser seguido da expressão “*et al.*” (redigido em itálico). Exemplo: “SOARES *et al.* (1978) constataram...” ou “Tal fato foi constatado na África (SOARES *et al.*, 1978).”

- para o mesmo autor em anos diferentes, respeitar a ordem cronológica, separando os anos por vírgula. Exemplo: “De acordo com SILVA (1980, 1985)...”

- para citação de vários autores sequencialmente, respeitar a ordem cronológica do ano de publicação e separá-los por ponto e vírgula.

Exemplo: “...nos viveiros comerciais (SILVA, 1980; FERREIRA, 1999; GIAMAS e BARBIERI, 2002)...”

- Ainda, quando for **ABSOLUTAMENTE** necessário referenciar um autor citado em trabalho consultado, o nome desse autor será citado apenas no texto (**em letras minúsculas**), indicando-se, entre vírgulas e precedido da palavra latina *apud*, o nome do autor do trabalho consultado, o qual irá figurar na listagem de referências. Ex.: “Segundo Gulland, *apud* SANTOS (1978), os coeficientes...”.

Citações na listagem de REFERÊNCIAS

1. *Documentos impressos* – Para dois autores, relacionar os artigos referidos no texto, com o sobrenome dos autores (em letras **maiúsculas**), das iniciais dos prenomes (separadas por ponto, sem espaço), separados por “e”, “and” ou “y”, se o texto **submetido** (ou seja, o SEU trabalho) for **redigido** em português, inglês ou espanhol, respectivamente.

Se mais de dois autores, separá-los por ponto e vírgula.

As referências devem ser ordenadas alfabeticamente pelo sobrenome do autor. Havendo mais de uma obra com a mesma entrada, considera-se a ordem cronológica e, em seguida, a alfabética do terceiro elemento da referência.

Exemplos:

a) Artigo de periódico

BARBIERI, G. e SANTOS, E.P. dos 1980 Dinâmica da nutrição de *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824), na represa do Lobo, Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 32(1): 87-89

WOHLFARTH, G.W.; MOAY, R.; HULATA, G. 1983 A genotype-environment interaction for growth rate in the common carp, growing in intensively manured ponds. *Aquaculture*, Amsterdam, 33: 187-195.

b) Dissertação e tese (utilizar apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário)

SOUZA, K.M. 2008 *Avaliação da política pública do defeso e análise socioeconômica dos pescadores de camarão-setebarbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) do Perequê – Guarujá, São Paulo, Brasil*. Santos. 113p. (Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesca, APTA). Disponível em:

<http://www.pesca.sp.gov.br/dissertacoes_pg.php> Acesso em: 22 ago. 2009.

c) Livro

GOMES, F.P. 1978 *Curso de estatística experimental*. 8ª ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 430p.

ENGLE, R.F. and GRANGER, C.W.J. 1991 *Long-run economic relationship: readings in cointegration*. New York: Oxford University Press. 301p.

d) Capítulo de livro e publicação em obras coletivas

MACKINNON, J.G. 1991 Critical values for cointegration tests. In: ENGLE, R.F. and GRANGER, C.W.J. *Long-run economic relationship: readings in cointegration*. New York: Oxford University Press. p.267-276.

e) Publicação em anais e congêneres de congresso, reunião, seminário (utilizar RESUMOS como referência apenas quando ABSOLUTAMENTE necessário)

AMORIM, A.F. e ARFELLI, C.A. 1977 Contribuição ao conhecimento da biologia e pesca do espadarte e agulhões no litoral Sul-Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO PAULISTA DE AGRONOMIA, 1., São Paulo, 5-9/set./1977. *Anais...* São Paulo: Associação de Engenheiros Agrônomos. p.197-199.

ÁVILA-DA-SILVA, A.O.; CARNEIRO, M.H.; FAGUNDES, L. 1999 Gerenciador de banco de

dados de controle estatístico de produção pesqueira marítima – ProPesq@. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 11.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ENGENHARIA DE PESCA, 1., Recife, 17-21/out./1999. *Anais...* v..2, p.824-832.

2. Meios eletrônicos (Documentos consultados *online* e em CD-ROM)

- Utilizar as normas de referência de *documentos impressos*, acrescentando o endereço eletrônico em que o documento foi consultado e a data do acesso.

Exemplos:

CASTRO, P.M.G. (sem data) *A pesca de recursos demersais e suas transformações temporais*.

Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br/textos.php>> Acesso em: 3 set. 2004.

SILVA, R.N. e OLIVEIRA, R. 1996 Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., Recife, 1996.

Anais eletrônicos... Disponível em: <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21 jan. 1997.

NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; TABATA; RIGOLINO; VERÍSSIMO-SILVEIRA
2002

Cryopreservation of rainbow trout semen: diluent, straw and the vapor column. *B. Inst. Pesca*,
São Paulo, 28(2): 135-139. Disponível
em:

<http://www.pesca.sp.gov.br/boletins_online.php> Acesso em: 21 set. 2009.

TOLEDO PIZA, A.R.; LOBÃO, V.L.; FAHL, W.O. 2003 Crescimento de *Achatina fulica* (gigante africano) (Mollusca: Gastropoda) em função da densidade de estocagem. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 55., Recife, 14-18 jul./2003. *Anais...* Recife: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 1 CD-ROM.

OBSERVAÇÕES:

1. Fórmulas, expressões e equações matemáticas

Podem ser escritas inseridas no texto, se não apresentarem caracteres especiais; caso contrário, devem ser apresentadas isoladamente na linha. Exemplo: Ganho de peso = peso final – peso inicial.

2. Unidades de medida

Devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades (SI). Exemplo: 10 m²; 100 peixes m⁻¹; 20 t ha⁻¹.

3. Anexos e apêndice Devem ser incluídos apenas quando imprescindíveis à compreensão do trabalho. Caberá aos Revisores e Editores julgar a necessidade de sua publicação.

LISTA DE CHECAGEM

1. Preparar Ofício de encaminhamento (**modelo no link Documentos – download**), devidamente assinados pelos autores (**preferencialmente**) ou pelo autor responsável.
2. Verificar se o texto, incluindo Tabelas e Figuras, está digitado em fonte Book Antiqua, tamanho 11, com espaçamento 1,5, em página A4, com margens superior e inferior de 3,0 cm, e esquerda e direita de 2,5 cm.
3. Verificar se o texto não excede o limite de 25 páginas (artigo científicos e artigo de revisão), 15 páginas (relato de caso) ou 10 páginas (nota científica), incluindo Tabelas e Figuras e Referências, e se as linhas foram numeradas sequencialmente, da primeira à última página.
4. Verificar se o Resumo e o Abstract não excedem o limite de 250 palavras (artigo científico e artigo de revisão) ou de 150 palavras (nota científica e relato de caso).
5. Verificar se todas as informações sobre os autores estão completas (nome completo, filiação, endereço institucional e e-mail).
6. Fazer revisão linguística criteriosa do texto.
7. Verificar se as Citações e Referências estão de acordo com as normas adotadas pelo Boletim e devidamente correlacionadas.
8. Verificar se as Tabelas e Figuras estão formatadas de acordo com as normas, não excedendo 16 cm de largura.
9. Enviar, via correio, uma cópia impressa do texto original, uma cópia gravada em CD-ROM (arquivo “doc”), devidamente identificado, e os demais documentos solicitados e, via e-mail, uma cópia (arquivo “doc”, devidamente identificado). É de total responsabilidade do autor a integridade dos textos enviados.
10. A documentação que não atender estritamente a estas normas não será aceita.
11. Após a aprovação, encaminhar a Cessão de Direitos Autorais e Autorização para publicação em meio eletrônico (**modelo no link Documentos – download**) devidamente assinados pelos autores (**preferencialmente**) ou pelo autor responsável.

ANEXO II

Instruções aos autores – *Brazilian Journal of Biology*

Finalidade e normas gerais

O *Brazilian Journal of Biology* publica resultados de pesquisa original em qualquer ramo das ciências biológicas. Estará sendo estimulada a publicação de trabalhos nas áreas de biologia celular, sistemática, ecologia (auto-ecologia e sinecologia) e biologia evolutiva, e que abordem problemas da região neotropical.

A revista publica somente artigos em inglês. Artigos de revisões de temas gerais também serão publicados desde que previamente propostos e aprovados pela Comissão Editorial.

Informações Gerais: Os originais deverão ser enviados à Comissão Editorial e estar de acordo com as Instruções aos Autores, trabalhos que não se enquadrem nesses moldes serão imediatamente devolvidos ao(s) autor(es) para reformulação.

Os trabalhos que estejam de acordo com as Instruções aos Autores, serão enviados aos assessores científicos, indicados pela Comissão Editorial. Em cada caso, o parecer será transmitido anonimamente aos autores. Em caso de recomendação desfavorável por parte de um assessor, será usualmente pedida a opinião de um outro. Os trabalhos serão publicados na ordem de aceitação pela Comissão Editorial, e não de seu recebimento.

Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista.

Preparação de originais

O trabalho a ser considerado para publicação deve obedecer às seguintes recomendações gerais:

Ser digitado e impresso em um só lado do papel tipo A4 e em espaço duplo com uma margem de 3 cm à esquerda e 2 cm à direita, sem preocupação de que as linhas terminem alinhadas e sem dividir palavras no final da linha. Palavras a serem impressas em itálico podem ser sublinhadas.

O título deve dar uma idéia precisa do conteúdo e ser o mais curto possível. Um título abreviado deve ser fornecido para impressão nas cabeças de página.

Nomes dos autores – As indicações Júnior, Filho, Neto, Sobrinho etc. devem ser sempre antecidas por um hífen. Exemplo: J. Pereira-Neto. Usar também hífen para nomes compostos (exemplos: C. Azevedo-Ramos, M. L. López-Rulf). Os nomes dos autores devem constar sempre na sua ordem correta, sem inversões. Não usar nunca, como autor ou

co-autor nomes como Pereira-Neto J. Usar *e, y, and, et* em vez de & para ligar o último co-autor aos antecedentes.

Os trabalhos devem ser redigidos de forma concisa, com a exatidão e a clareza necessárias para sua fiel compreensão. Sua redação deve ser definitiva a fim de evitar modificações nas provas de impressão, muito onerosas e cujo pagamento ficará sempre a cargo do autor. Os trabalhos (incluindo ilustração e tabelas) devem ser submetidos através da interface de administração do sistema “Submission da SciELO” cujo endereço www.scielo.br/bjb (SUBMISSÃO - ONLINE).

Serão considerados para publicação apenas os artigos redigidos em inglês. Todos os trabalhos deverão ter resumos em inglês e português. Esses resumos deverão constar no início do trabalho e iniciar com o título traduzido para o idioma correspondente. O Abstract e o Resumo devem conter as mesmas informações e sempre sumariar resultados e conclusões.

Em linhas gerais, as diferentes partes dos artigos devem ter a seguinte seriação:

1ª página – Título do trabalho. Nome(s) do(s) autor(es). Instituição ou instituições, com endereço. Indicação do número de figuras existentes no trabalho. Palavras-chave em português e inglês (no máximo 5). Título abreviado para cabeça das páginas. Rodapé: nome do autor correspondente e endereço atual (se for o caso).

2ª página e seguintes – Abstract (sem título). Resumo: em português (com título); Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos.

Em separado - Referências, Legendas das figuras, Tabelas e Figuras.

As seguintes informações devem acompanhar todas as espécies citadas no artigo:

- Para zoologia, o nome do autor e da data de publicação da descrição original deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos;
- Para botânica e ecologia, somente o nome do autor que fez a descrição deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos.

O trabalho deverá ter, *no máximo*, 25 páginas, incluindo tabelas e figuras, em caso de Notes and Comments limitar-se a 4 páginas.

A seriação dos itens de Introdução e Agradecimentos só se aplicam, obviamente, a trabalhos capazes de adotá-la. Os demais artigos (como os de Sistemática) devem ser redigidos de acordo com critérios geralmente aceitos na área.

Referências Bibliográficas:

1. Citação no texto: Use o nome e o ano de publicação: Reis (1980); (Reis, 1980); (Zaluar and Rocha, 2000); Zaluar and Rocha (2000). Se houver mais de dois autores, usar “et al.”

2. Citações na lista de referências devem estar em conformidade com a norma **ISO 690/2010**.

No texto, será usado o sistema autor-ano para citações bibliográficas (estritamente o necessário), utilizando-se “**and**” no caso de 2 autores. As referências, digitadas em folha separada, devem constar em ordem alfabética. Nas referências de artigos de periódicos deverão conter nome(s) e iniciais do(s) autor(es), ano, título por extenso, nome da revista (por extenso e em itálico), volume, número, primeira e última páginas. Referências de livros e monografias deverão também incluir a editora e, conforme citação, referir o capítulo do livro. Deve(m) também ser referido(s) nome(s) do(s) organizador(es) da coletânea. Exemplos:

Livro:

LOMINADZE, D.G., 1981. *Cyclotron waves in plasma*. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press. 206 p. International series in natural philosophy, no. 3.

Capítulo de livro:
WRIGLEY, E.A., 1968. Parish registers and the historian. In: D. J. STEEL, ed. *National index of parish registers*. London: Society of Genealogists, pp. 15-167.

Artigo de periódico:
CYRINO, J.E. and MULVANEY, D.R., 1999. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells--BB line. *Revista Brasileira de Biologia = Brazilian Journal of Biology*, vol. 59, no. 3, pp. 517-525. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081999000300017>. PMID: 10765463.

Dissertação ou tese:
LIMA, P.R.S., 2004. *Dinâmica populacional da Serra Scomberomorus brasiliensis (Osteichthyes; Scombridae), no litoral ocidental do Maranhã-Brasil*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 45 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Trabalho apresentado em evento:
RANDALL, D.J., HUNG, C.Y. and POON, W.L., 2004. Response of aquatic vertebrates to hypoxia. In: *Proceedings of the Eighth International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality*, October 12-14, Chongqing, China. Athens, Georgia, USA:

EPA, 2006, pp. 1-10.

Referência disponível online:
AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA, 2013 [viewed 4 February 2013]. *Hidro Web: Sistema de Informações hidrológicas* [online]. Available from: <http://hidroweb.ana.gov.br/>

A Revista publicará um Índice inteiramente em inglês, para uso das revistas internacionais de referência.

As provas serão enviadas aos autores para uma revisão final (restrita a erros e composição) e deverão ser devolvidas imediatamente. As provas que não forem devolvidas no tempo solicitado - 5 dias - terão sua publicação postergada para uma próxima oportunidade, dependendo de espaço.

Material Ilustrativo – Os autores deverão limitar as tabelas e as figuras (ambas numeradas em arábicos) ao **estritamente necessário**. No texto do manuscrito, o autor indicará os locais onde elas deverão ser intercaladas.

As tabelas deverão ter seu próprio título e, em rodapé, as demais informações explicativas. Símbolos e abreviaturas devem ser definidos no texto principal e/ou legendas.

Na preparação do material ilustrativo e das tabelas, deve-se ter em mente o tamanho da página útil da REVISTA (22 cm x 15,0 cm); (coluna: 7 cm) e a idéia de conservar o sentido vertical. Desenhos e fotografias exageradamente grandes poderão perder muito em nitidez quando forem reduzidos às dimensões da página útil. As pranchas deverão ter no máximo 30 cm de altura por 25 cm de largura e incluir barra(s) de calibração.

As ilustrações devem ser agrupadas, sempre que possível. A Comissão Editorial reserva-se o direito de dispor esse material do modo mais econômico, sem prejudicar sua apresentação.

Disquete – Os autores são encorajados a enviar a versão final (e somente a final), **já aceita**, de seus manuscritos em disquete. Textos devem ser preparados em Word for Windows e acompanhados de uma cópia idêntica em papel.

Recomendações Finais: Antes de remeter seu trabalho, preparado de acordo com as instruções anteriores, deve o autor relê-lo cuidadosamente, dando atenção aos seguintes itens: correção gramatical, correção datilográfica (apenas uma leitura sílaba por sílaba a garantir), **correspondência entre os trabalhos citados no texto e os referidos na bibliografia**, tabelas e figuras em arábicos, correspondência entre os números de tabelas e figuras citadas no texto e os referidos em cada um e posição correta das legendas.

Taxa de Publicação

Este periódico cobra apenas a seguinte taxa aos autores:

Custo por página diagramada R\$ 200,00 (vigência 2016)