

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Ciências Veterinárias

Dissertação de Mestrado

**Contribuição para o conhecimento de nematodes
Huffmanella spp. como causa de rejeição em lota da
faneca (*Trisopterus luscus*)**

Ana Raquel Almeida Carvalho

Orientadora: Professora Doutora Alexandra Sofia Miguéns Fidalgo Esteves

Co-Orientadora: Doutora Paula Cristina Rodrigues de Sousa Ramos



**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO
VILA REAL, 2012**

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Ciências Veterinárias

Dissertação de Mestrado

**Contribuição para o conhecimento de nematodes
Huffmanella spp. como causa de rejeição em lota da
faneca (*Trisopterus luscus*)**

Ana Raquel Almeida Carvalho

Orientadora: Professora Doutora Alexandra Sofia Miguéns Fidalgo Esteves

Co-Orientadora: Doutora Paula Cristina Rodrigues de Sousa Ramos



**UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO
VILA REAL, 2012**

*“Um guerreiro da luz nunca esquece a gratidão.
Durante a luta, foi ajudado pelos anjos;
as forças celestiais colocaram cada coisa no seu lugar,
e permitiram que ele pudesse dar o melhor de si.”*

Paulo Coelho – “O ZAHIR”

Contextualização

O meu estágio teve início no mês de dezembro de 2011, na lota da Figueira da Foz e terminou no final de abril de 2012 no IPIMAR/INRB. Durante o período que estagiei na lota, aprofundei conhecimentos na área de inspeção do pescado e tive oportunidade de acompanhar todas as outras atividades do veterinário oficial. Apresento, em anexo, alguns dados relativos ao ato de inspeção. O grande objetivo do estágio na lota foi recolher as amostras de faneca que permitiram executar este projeto.

O estágio continuou, depois, no IPIMAR/INRB, proporcionando-me a possibilidade de analisar as amostras em causa. Participei em todas as atividades laboratoriais de investigação que decorreram no Departamento de Aquacultura e no Laboratório de Patologia de Animais Aquáticos deste Instituto.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Alexandra Esteves, por acreditar em mim, desde o início, enquanto executante deste estudo, e pela sua colaboração e dedicação no mesmo.

Obrigada, à minha co-orientadora, Doutora Paula Ramos, pela sua profunda dedicação, por ter partilhado comigo tantos conhecimentos e pelos seus incansáveis estímulos.

Agradeço a toda a massa humana da Lota da Figueira da Foz, que me recebeu tão calorosamente. Ao Doutor Nuno Nazário, à Doutora Luísa Monteiro e à Doutora Ana Viana pela forma carinhosa como me trataram e pelos conhecimentos que me transmitiram enquanto médicos veterinários oficiais.

Agradeço ao IPIMAR/INRB por me ter recebido para terminar este projeto. À D. Augusta Moledo pela ajuda preciosa em todas as práticas laboratoriais.

Agradeço aos meus amados pais e à minha mana por me apoiarem incondicionalmente ao longo da vida. Sem eles nada teria sentido.

Obrigada ao João por todo o amor que me dedica a cada milésimo de segundo.

Finalmente, agradeço a todos os que com um simples sorriso me ensinaram tanto.

Durante esta experiência, mais do que conhecimentos, foram partilhadas vidas de forma genuína.

Resumo

Os nematodes do género *Huffmanella* são parasitas histozoicos que infetam sobretudo os músculos das regiões abdominais e dorsais da faneca, *Trisopterus luscus*. Os peixes são rejeitados em lota devido à alteração da cor da pele que apresenta manchas escuras devido à presença de ovos castanhos embrionados. As variações de cor observadas nos músculos destes peixes sugerem que a infeção é feita através do tubo digestivo, inicialmente para a musculatura envolvente da cavidade abdominal. Através do exame histopatológico, observaram-se ovos biopericulados, com superfície lisa, imaturos (hialinos), com tamanho médio de 41,4x32,2 µm, e ovos embrionados (castanhos), com tamanho médio de 68x38,2 µm, com localização intracelular ou, na sua maioria, extracelular. Observaram-se porções de larvas ou parasitas adultos com a mesma localização. Os ovos encontravam-se dispostos linearmente ou aleatoriamente sugerindo movimentos migratórios de uma ou mais fêmeas. Os ovos em fila encontravam-se unidos por um tecido unitivo observado em microscopia eletrónica de varrimento (MEV).

Palavras-chave: Nematodes • *Huffmanella* • Parasitas histozoicos • *Trisopterus luscus* • Manchas escuras • Ovos imaturos • Ovos embrionados • Tecido unitivo

Abstract

The nematodes of the genus *Huffmanella* are a histozoic parasites which mainly infects the muscles of the abdominal and dorsal regions of the pouting, *Trisopterus luscus*. Fish are rejected at initial auction because of an alteration in skin colour which presents dark markings due to the presence of embryonated brown eggs. The variations of colour observed in the muscles of these fish suggest that infection is affected through the digestive tube, initially to the surrounding muscular structures of the abdominal cavity. The histopathological examination, revealed biopericulated eggs which presented a smooth surface, were immature (hyaline), averaging 41,4x32,2 µm in size, and embryonated eggs, (brown), 68x38,2 µm on average, and were in either intracellular or, for the greater part, extracellular locations. Portions of larvae or adult parasites were observed in the same locations. The eggs were in lines or in random positions suggesting migratory movements of one or more females. The eggs in lines were bound together by unitive tissue observed with a scanning electron microscope (SEM).

Key-words: Nematodes • *Huffmanella* • Histozoic parasite • *Trisopterus luscus* • Dark markings • Immature eggs • Embryonated eggs • Unitive tissue

Lista de Abreviaturas, Siglas/Acrónimos e Sinais/Símbolos:

- CE: Comissão Europeia
- cm: Centímetro
- cm²: Centímetro quadrado
- DGV: Direção Geral de Veterinária
- FAO: Food and Agriculture Organization
- g: Grama
- °: Graus
- °C: Graus Celsius
- h: Hora
- HD: Hospedeiro definitivo
- H&E: Hematoxilina e eosina
- IPIMAR/INRB: Instituto das Pescas e do Mar/Instituto Nacional dos Recursos Biológicos
- IM: Intramuscular
- ®: Marca registada
- m: Metro
- µm: Micra
- MEV: Microscopia Eletrónica de Varrimento
- mm: Milímetro
- min: Minuto
- €: Moeda “Euro”
- \$: Moeda “Escudo”
- M: Molar
- nº: Número
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- %: Percentagem
- ‰: Permilagem
- PCON: Plano de Controlo Oficial de Navios
- kg: Quilograma
- KV: Quilovolt
- UE: União Europeia
- U.S.A.: United States of America

ÍNDICE GERAL:

| | |
|--|-----------|
| Contextualização | ii |
| Agradecimentos..... | ii |
| Resumo | iv |
| Abstract | iv |
| LISTA DE FIGURAS:..... | viii |
| LISTA DE QUADROS:..... | x |
| LISTA DE TABELAS:..... | x |
| I. Revisão bibliográfica..... | 11 |
| 1. Introdução | 11 |
| 1.1 Taxonomia: <i>Trisopterus luscus</i> | 11 |
| 1.2 Características morfológicas e ciclo de vida da faneca..... | 12 |
| 1.3 Alimentação..... | 13 |
| 1.4 Distribuição geográfica/ <i>Habitat</i> | 14 |
| 1.5 Importância comercial da faneca | 14 |
| 1.6 Inspeção sanitária da faneca - causas de rejeição..... | 16 |
| 1.7 Parasitas identificados na faneca..... | 17 |
| 1.8 <i>Huffmanella</i> spp. (Nematode: <i>Trichosomoididae</i>) | 18 |
| II. Trabalho Experimental | 25 |
| 1. Objetivos do trabalho..... | 25 |
| 2. Material e Métodos..... | 25 |
| 2.1 Amostra | 25 |
| 2.2 Métodos..... | 26 |
| III. Resultados | 31 |
| 1. Descrição macroscópica das fanecas amostradas..... | 31 |
| 2. Estudo histopatológico | 34 |
| 2.1 Ovos em diferentes estadios de maturação..... | 36 |
| 2.2 Alterações musculares..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Estudo com recurso à microscopia eletrónica de varrimento..... | 43 |
| IV. Discussão | 45 |
| V. Conclusão | 51 |
| VI. Bibliografia..... | 52 |
| VII. ANEXOS | 57 |

LISTA DE FIGURAS:

| | |
|---|----|
| Figura 1- Representação esquemática da espécie <i>Trisopterus luscus</i> | 12 |
| Figura 2- Fotografia de uma faneca fresca..... | 13 |
| Figura 3- Representação esquemática da distribuição geográfica da espécie <i>Trisopterus luscus</i> | 14 |
| Figura 4- Quantidade de faneca vendida no mês de novembro | 15 |
| Figura 5- Representação esquemática da constituição química da parede do ovo de <i>Huffmanella huffmanii</i> | 23 |
| Figura 6- Descrição dos termos usados na orientação dos animais..... | 27 |
| Figura 7- Representação gráfica das incisões realizadas na necrópsia para recolha de tecido parasitado | 28 |
| Figura 8- Representação esquemática dos músculos da faneca. | 33 |
| Figura 9- Músculo de faneca. Corte longitudinal. Sem pigmentação, correspondente ao grau 0. | 35 |
| Figura 10- Músculo de faneca. Corte longitudinal. Intensidade de pigmentação correspondente ao grau 1..... | 35 |
| Figura 11- Músculo de faneca. Corte longitudinal. Intensidade de pigmentação correspondente ao grau 2..... | 35 |
| Figura 12- Músculo de faneca. Corte longitudinal. Intensidade de pigmentação correspondente ao grau 3..... | 35 |
| Figura 13- Músculo de faneca. Corte longitudinal. (A) Aglomerado de ovos imaturos; (B) Ovos imaturos dispostos em fila. | 36 |
| Figura 14- Músculo de faneca. Corte longitudinal. (A) Ovos com parede castanha, operculados e com larva no interior; (B) Ovos de parede castanha e com larva no interior. | 37 |
| Figura 15- Músculo de faneca. Corte longitudinal. (A) Ovos castanhos operculados em diferentes estadios de desenvolvimento; (B) Ovos castanhos, operculados e morulados.. | 37 |
| Figura 16- Músculo de faneca. Corte longitudinal. Ovo castanho embrionado com larva a perfurar a parede | 38 |
| Figura 17- Músculo de faneca. Corte transversal. Ovo com parede castanha e vazio..... | 38 |
| Figura 18- Músculo de faneca. (A) Corte longitudinal. Larva(s) livre(s). (B) Corte transversal. Larva no interior de uma célula muscular. | 39 |
| Figura 19- Músculo de faneca. (A) Corte longitudinal. Ovos dispostos em fila do tipo imaturo e embrionado; (B) Corte longitudinal. Ovos castanhos e hialinos do tipo | |

| | |
|--|----|
| embrionado; (C) Corte transversal. Ovos em diferentes estadios de maturação; (D) Corte transversal. Ovos em diferentes localizações. | 40 |
| Figura 20- Músculo de faneca. (A) e (B) Reacção inflamatória difusa envolvendo ovos em diferentes estadios de maturação. Corte transversal e corte longitudinal..... | 41 |
| Figura 21- Músculo de faneca. (A) Corte transversal. Granulomas multifocais; (B) Corte transversal. Granuloma com 6 ovos no seu interior em diferentes estadios; (C) Corte transversal. Ganuloma com ovo castanho; (D) Corte longitudinal. Granuloma com ovos castanhos e hialinos.. | 42 |
| Figura 22- Músculo de faneca. (A) Corte longitudinal. Calcificação do tecido muscular; (B) Corte transversal. Alteração degenerativa com formação de estruturas quísticas de natureza parasitária | 43 |
| Figura 23- Músculo da faneca: MEV. (A) Ovos de <i>Huffmanella</i> spp. dispostos em fila e unidos pelos opérculos por tecido unitivo. (B) Ampliação da imagem anterior; (C) Ovo de <i>Huffmanella</i> spp., à superfície do tecido muscular..... | 44 |

LISTA DE QUADROS:

Quadro 1- Principais diferenças morfológicas entre a faneca, o fanecão e o badejo.....11

LISTA DE TABELAS:

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Parasitas identificados na faneca | 17 |
| Tabela 2- Espécies de <i>Huffmanella</i> spp. identificadas | 20 |
| Tabela 3- Registo morfométrico dos exemplares estudados | 26 |
| Tabela 4- Escala de graus de alteração de cor | 27 |
| Tabela 5- Escala de conversão | 30 |
| Tabela 6- Descrição macroscópica e classificação das alterações de cor das fanecas | 31 |
| Tabela 7- Exemplos de fanecas com grande discrepância entre o grau de alteração de cor atribuído e a intensidade de pigmentação muscular | 32 |

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

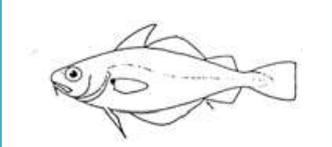
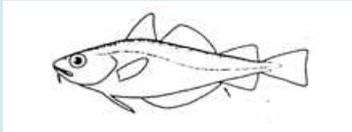
1.1 Taxonomia: *Trisopterus luscus*

A faneca, *Trisopterus luscus* (Linnaeus, 1758), pertence à classe *Osteichthyes*, à ordem dos Gadiformes e à família *Gadidae* (Rafinesque, 1810).

Segundo Svetovidov (1948) (cit. Delling *et al.*, 2010), dentro do género *Trisopterus*, existem três espécies distintas: *T. esmarkii* (Nilsson, 1855), *T. luscus* e *T. minutus* (Linnaeus, 1758) (Froese & Pauly, 2011).

Na costa portuguesa, além da faneca, existe, segundo Castro (1967), a espécie *T. minutus*, que é vulgarmente conhecida como “fanecão”, cujas semelhanças com a faneca podem suscitar alguma confusão (Sobral, 1983). O mesmo se pode verificar em relação ao “badejo”, *Merlangius merlangus* (Linnaeus, 1758), sobretudo quando este ainda é jovem (Sanches, 1992) (quadro 1).

Quadro 1- Principais diferenças morfológicas entre a faneca, o fanecão e o badejo (adaptado de Sanches, 1992).

| | | |
|-----------------------|---|--|
| <p>Faneca</p> |  | <p>Altura do corpo maior que o comprimento da cabeça. Comprimento da primeira barbatana anal maior que a distância pré-anal. Malha negra na base das barbatanas peitorais. Barbatanas anais ligadas na base. Um barbilho no mento.</p> |
| <p>Fanecão</p> |  | <p>Altura do corpo menor que o comprimento da cabeça. Comprimento da base da primeira barbatana anal menor que a distância pré-anal. Barbatanas anais ligeiramente afastadas na base.</p> |
| <p>Badejo</p> |  | <p>Corpo alongado. Barbilho rudimentar ou ausente no mento.</p> |

1.2 Características morfológicas e ciclo de vida da faneca

A faneca é um peixe teleósteo com corpo simétrico, cujo comprimento do adulto varia entre os 30 cm e 46 cm. O número de vértebras situa-se entre 47 e 49 (Svetovidov, 1986) e o seu corpo caracteriza-se por ser alongado, mas nitidamente alto, estando comprimido lateralmente na porção anterior (Machado, 1983), onde a linha lateral é acentuadamente curva (Svetovidov, 1986).

Segundo Chevey (1929) (cit. Machado, 1983), a faneca tem uma face obtusa e não proeminente. Os dentes têm pequenas dimensões e estão implantados em maxilas quase iguais. Segundo o mesmo autor, a faneca apresenta sempre um barbilho bem desenvolvido na mandíbula. Os seus olhos são grandes e com aspeto de bolbo, dado que a córnea está solta e pode formar uma câmara que se enche com gás ou fluido. A espécie apresenta três barbatanas dorsais, contínuas, mas não unidas. A primeira e a terceira são sensivelmente do mesmo comprimento, mas muito diferentes no seu formato, uma vez que a primeira é mais alta, pontiaguda, assumindo uma forma triangular. A segunda barbatana é a mais alta das três (figura 1).

Quanto às barbatanas anais, encontram-se unidas pela base e a primeira é significativamente mais longa que a segunda (Machado, 1983). A primeira barbatana anal situa-se por baixo da metade anterior da primeira barbatana dorsal, contendo três vezes o comprimento desta. A barbatana anal representa 35,1 a 44,3% do comprimento do peixe (Sobral, 1983).

No que se refere às barbatanas pélvicas, estas inserem-se na superfície ventral, na zona do esófago, são estreitas e muito compridas, estendendo-se para além do ângulo de inserção da primeira barbatana dorsal.

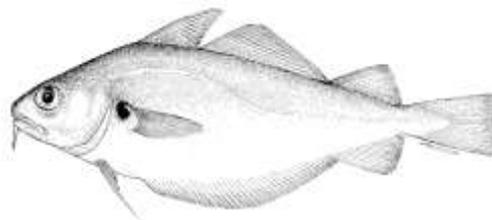


Figura 1- Representação esquemática da espécie *Trisopterus luscus* (Froese & Pauly, 2011).

A barbatana caudal tem um aspeto quadrado e um bordo posterior truncado (Machado, 1983).

A faneca possui cor vermelha pardacenta no dorso, que se vai atenuando gradualmente com tons cinzento-azulados até atingir o branco prateado nos flancos. O seu ventre é branco e, junto à margem superior da base da barbatana peitoral, existe uma mancha negra muito distinta (Sobral, 1983) (figura 2). O corpo está coberto de escamas de pequenas dimensões e caducas (Machado, 1983).



Figura 2- Fotografia de uma faneca fresca.

De acordo com Hoek (1910) (cit. Sobral, 1983), trata-se de uma espécie ovípara em que a fecundação é externa. A ovipostura ocorre em águas pouco profundas (até aos 60 m), a temperaturas não inferiores a 8-9 °C e com uma salinidade de cerca de 32 a 35‰. Após o período de incubação de 10-12 dias, o ovo dá origem a uma larva que, ao atingir os 50 a 75 mm, começa a desenvolver as barbatanas, as escamas e a sua pigmentação, dando origem ao indivíduo adulto (Sobral, 1983), cuja longevidade pode atingir os quatro anos (Froese & Pauly, 2011).

1.3 Alimentação

As fanecas possuem ritmos alimentares bem definidos. Após o período de alimentação matinal, segue-se um período de repouso que termina no final da tarde com uma maior quantidade de comida ingerida. Além deste, um outro período de alimentação pode estar relacionado com as fases lunares, uma vez que foram capturados indivíduos no estado larvar que se alimentavam apenas nas noites próximas da lua cheia. Os estados larvares da faneca alimentam-se sobretudo de fitoplâncton, dinoflagelados, tintinídeos, copépodes e isópodes (Machado, 1983), enquanto que os indivíduos adultos se alimentam maioritariamente de crustáceos, pequenos peixes e moluscos (Svetovidov, 1986).

1.4 Distribuição geográfica/*Habitat*

A faneca é uma espécie costeira cujo limite de distribuição é o Oceano Atlântico, entre os 29° e 60° de latitude, sendo, assim por isso, uma espécie de águas temperadas do Hemisfério Norte. Esta espécie tem maior abundância na costa atlântica francesa e no Canal da Mancha (Sobral, 1983), embora se encontre com bastante facilidade no Oceano Atlântico ocidental e na zona ocidental do Mar Mediterrâneo (figura 3).

No que se refere ao *habitat*, esta espécie encontra-se geralmente em águas pouco profundas (espécie bentoplágica), entre os 30 e os 100 m de profundidade (Froese & Pauly, 2011), com preferência para fundos de areia ou pedra, o que, segundo Nobre (1935) pode estar relacionado com a variação da intensidade da sua cor (Sobral, 1983).

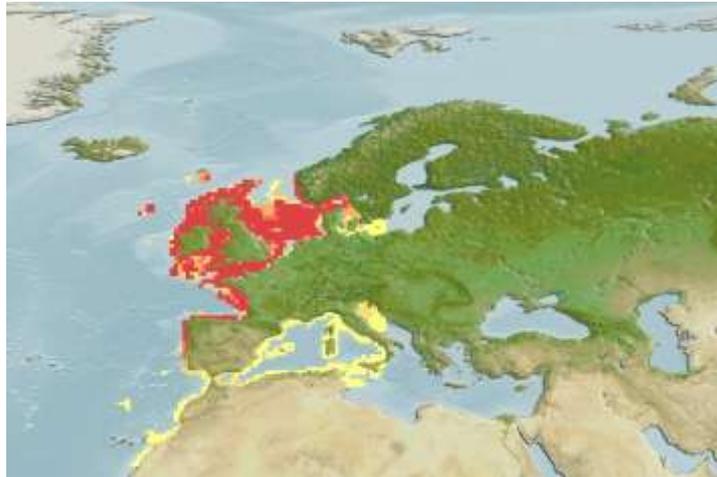


Figura 3 - Representação esquemática da distribuição geográfica da espécie *Trisopterus luscus*. As zonas a vermelho representam maior densidade populacional desta espécie e nas zonas a amarelo estão representadas as áreas de densidade populacional moderada (Froese & Pauly, 2011).

1.5 Importância comercial da faneca

A importância da pesca como atividade económica, ao longo dos tempos, é inquestionável, manifestando-se, por exemplo, na cunhagem de moedas (escudos), com motivos alusivos à pesca. Desde o século XIX até meados do século XX que os hábitos de consumo de peixe não se alteraram muito, à exceção de uma maior abundância no abastecimento de pescado, em particular de sardinha salgada e de bacalhau seco.

Embora Portugal seja um importante produtor de conservas de peixe, o seu consumo a nível interno nunca substituiu o peixe fresco ou salgado (Nunes *et al.*, 2008).

A tradição dos portugueses enquanto apreciadores de pescado leva a que, segundo os dados mais recentes, o consumo *per capita* seja de 56,5 kg/ano/habitante, o

que torna Portugal no país com maior consumo *per capita* de pescado da União Europeia (UE) a 25 onde o valor médio se situa à volta de 22,7 Kg/ano/habitante (dados de 2001) (Dias, 2008).

Neste seguimento, a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) das Nações Unidas e a Organização Mundial de Saúde (OMS) emitiram um parecer conjunto, elaborado com o apoio técnico e científico de diversos especialistas mundiais, onde se destacam os benefícios do pescado no desenvolvimento neuronal e na prevenção de doenças cardiovasculares. Embora o valor nutricional do pescado seja muito variável, o recurso a peixes com menor valor de mercado, como a faneca, acaba por ser uma forma de se manter o hábito de consumo de peixe e, indiretamente, de se acompanharem as orientações da OMS. A faneca é explorada essencialmente na costa norte e centro do País, facto comprovado pelos dados disponíveis mais recentes. Na figura 4, estão identificadas as lotas nacionais onde a faneca fez parte das cinco espécies de pescado mais vendido durante o mês de novembro de 2011.



Figura 4- Quantidade de faneca vendida no mês de novembro (dados gentilmente cedidos pela Estatística Docca Pesca -Portos e Lotas).

Em novembro de 2011, o total de fanecas vendidas foi de 106700 Kg nas lotas referidas, tendo atingido um preço médio por quilograma de 1,784€. Este valor é três vezes superior ao que se registou no ano de 1982, que era de 115\$00 por kg (0,57€) (Machado, 1983).

1.6 Inspeção sanitária da faneca - causas de rejeição

A partir de abril de 1999, foi progressivamente implantada, em todas as lotas licenciadas, a inspeção higio-sanitária do pescado. Desde 2000, todas as lotas licenciadas dispõem, em permanência, de uma equipa de inspeção higio-sanitária, sob orientação da Direção Geral de Veterinária (DGV) (Carrapato, 2002). Os principais objetivos do veterinário oficial são controlar regularmente as condições de higiene do desembarque, averiguar a higiene dos manipuladores da lota e ainda garantir a segurança higio-sanitária do pescado fresco. As tarefas referidas têm suporte legal na seguinte legislação:

- Regulamento (CE) nº852/2004 da Comissão, que refere as condições gerais de higiene aplicáveis à produção primária e operações conexas;
- Regulamento (CE) nº853/2004 da Comissão, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal;
- Regulamento (CE) nº854/2004 da Comissão, que esclarece as regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano;
- Regulamento (CE) nº2406/96 da Comissão, que clarifica quais os critérios de frescura a avaliar;
- Regulamento (CE) nº2074/2005 da Comissão, que define os conceitos de parasitas visíveis e de infeção visual, bem como a determinação do tipo e frequência das observações;
- Regulamento (UE) nº1276/2011 da Comissão, que altera o anexo III do Regulamento (CE) nº853/2004, no que se refere ao tratamento para eliminar parasitas viáveis em produtos da pesca destinados ao consumo humano.

As principais causas de rejeição da faneca são comuns à maioria do restante pescado, podendo ser categorizadas em cinco grupos:

- A** - Peixes alterados (falsificados, avariados ou corruptos)
- B** - Peixes repugnantes (parasitados, com tumores e cheiros anormais)
- C** - Peixes com excessiva magreza
- D** - Peixes suspeitos de veicular microrganismos ou substâncias tóxicas
- E** - Outras causas não contempladas nos parâmetros anteriores

1.7 Parasitas identificados na faneca (*Trisopterus luscus*)

O conhecimento dos parasitas da faneca e da sua ação patogénica revela-se de grande interesse, do ponto de vista da saúde pública. De modo a simplificar esta temática, apresenta-se na tabela 1 uma síntese da revisão bibliográfica sobre os parasitas dos vários grupos taxonómicos identificados na faneca.

Tabela 1- Parasitas identificados na faneca.

| Classes | Localização anatómica | Ação patogénica | Importância em saúde pública (sim/não) | Proveniência do peixe | Referência bibliográfica |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--|--------------------------|-----------------------------------|
| Copepoda | | | | | |
| <i>Lernaecera lusci</i> | Linha lateral e cavidade braquial | | | Norte de Portugal | Eiras, 1984 |
| | Brânquias | | | Norte de Portugal | Eiras, 1986 |
| | Brânquias | | | Oceano Atlântico | Tirard <i>et al.</i> , 1996 |
| | Brânquias | | | Voordelta (Mar do Norte) | Van Damme & Ollevier, 1995 |
| Nematoda | | | | | |
| <i>Huffmanella</i> sp. | Músculo | | | Portugal | Mendes, 1996 |
| | Músculo | | | Portugal | Esteves <i>et al.</i> , 2009 |
| Larvas de anisacídeos | | | Sim | | Torre Molina <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Hysterothylacium aduncum</i> | | | | | Petter & Cabaret, 1995 |
| <i>Anisakis</i> spp. | Músculo e vísceras | | Sim | Baía de Biscaia, Espanha | Rello <i>et al.</i> , 2008 |
| Apicomplexa | | | | | |
| <i>Goussia cruciata</i> | Parênquima hepático | Reação inflamatória/Granulomas | | Portugal | Gestal & Azevedo, 2006 |
| Digenea | | | | | |
| <i>Neodiplostomum</i> sp. | Epiderme | | | Mamfshire | Bamber <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>Cryptocotyle lingua</i> | | | | Medway Estuary | Van Den Broek, 1979 |
| Monogenea | | | | | |
| <i>Diclidophora esmarkii</i> | Brânquias | | | Plymouth, U.S.A. | Llewellyn & Green, 1980 |
| <i>Diclidophora luscae</i> | Brânquias | | | Plymouth, U.S.A. | Llewellyn & Green, 1980 |
| <i>Diclidophora luscae</i> | Brânquias | | | Portugal | Ramos, 2012 (comunicação pessoal) |

1.8 *Huffmanella* spp. (Nematode: *Trichosomoididae*)

As infeções musculares por ovos do género *Huffmanella* spp. (Moravec, 1987) (*Trichineloidea: Trichosomoididae*) têm sido reportadas nos peixes, pois originam o escurecimento do músculo, que acaba por provocar significativas perdas económicas (Justine, 2004). De uma forma geral, os peixes infetados apresentam, no local de deposição dos ovos, pontos/manchas negras anormais à sua coloração típica, excetuando o caso da *H. moravecii* em que não se verifica nenhuma alteração cromatográfica (Carballo & Navone, 2007). Os peixes marinhos infetados por este parasita foram capturados no Oceano Pacífico e no Oceano Atlântico (Bullard *et al.*, 2012). Porém, encontra-se, referenciado por Huffman e Moravec (1988), um caso de *Huffmanella* (*H. huffmanii*) em peixes de água doce. Além dos peixes teleósteos, há quatro casos de infeção por *H. carcarhini* (MacCallum, 1925; Moravec, 1987), *H. lata* (Justine, 2005), *Huffmanella* sp. (MacLean *et al.*, 2006) e *H. cf. Carcarhini* (Bullard *et al.*, 2012), reportados em tubarões.

O nematode *Huffmanella* spp. nem sempre foi classificado como pertencendo à família *Trichosomoididae*. Foi com o contributo de Huffman e Moravec que, em 1988, se concluiu que este não pertencia à família *Capillaridae*. Estes autores foram pioneiros na descrição da morfologia dos indivíduos adultos que pertencem a este género, tendo constatado as suas semelhanças com a família *Trichosomoididae*. Uma característica semelhante nas duas famílias está relacionada com o mecanismo de dispersão dos ovos. No parasita *Huffmanella* spp., a localização dos ovos, quer na pele quer na mucosa das brânquias, sugere que a pele poderá ser a sua localização preferencial e as guelras o local que permite a dispersão dos mesmos. Estes dois mecanismos são também possíveis em *Capillaria hepatica*, que produz dois tipos de ovos, uns que vão para o ambiente e se desenvolvem até ao estado infetante e outros que se encontram no fígado e que acabam por ser ingeridos por outros animais (Carballo & Navone, 2007).

O parasita *Huffmanella* spp. infeta uma diversidade de tecidos, sendo na sua maioria extracelular, embora também se observe pontualmente a nível intracelular, revelando com isto possuir um micro-habitat específico (Bullard *et al.*, 2012). Deste modo, Moravec e Garibaldi (2000), consideram o local de infeção no hospedeiro uma característica suplementar para identificação da espécie em causa. No caso dos teleósteos foi observada a presença de ovos do parasita na pele: *H. paronai* (Moravec & Garibaldi, 2000), *H. canadensis* (Moravec *et al.*, 2005) e *H. moravenci* (Carballo & Navone, 2007). A presença de ovos no músculo observou-se nos casos *Huffmanella* sp. (Grabda & Ślósarczyk, 1981), *H. banningi* (Van Banning, 1980; Moravec, 1987), *Huffmanella* sp. (Gállego *et al.*, 1993), *H. shikokvensis* (Moravec *et al.*, 1998), *H. japonica* (Moravec *et al.*,

1998) e *Huffmanella* sp. (Esteves *et al.*, 2009). Na bexiga natatória foi observada nos casos *H. huffmani* (Huffman & Moravec, 1988; Žd'árská *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2004), *H. schouteni* (Moravec & Campbell, 1991; Moravec *et al.*, 2003), *H. mexicana* (Moravec & Fajer-Avila, 2000), *H. balista* (Justine, 2007) e *H. plectroni* (Justine, 2011) e, nos arcos branquiais observou-se nos casos de *H. branchialis* (Justine, 2004), *H. filamentosa* (Justine, 2004), *H. ossicola* (no tecido ósseo dos arcos braquias) (Justine, 2004) e *H. moravenci* (Carballo & Navone, 2007). Nos elasmobrânquios, observou-se a presença deste parasita na pele, nos casos de *H. carcarhini* (na mucosa dos arcos braquiais) (MacCallum, 1925, 1926a; Moravec, 1987), *H. lata* (Justine, 2005), *Huffmanella* sp. (MacLean *et al.*, 2006), *H. cf. carcarhini* (Bullard *et al.*, 2012), e nos arcos branquiais como em *H. carcarhini* (MacCallum, 1925, 1926a; Moravec, 1987).

Em 1988, Huffman e Moravec descreveram pela primeira vez a morfologia dos ovos de uma espécie pertencendo ao género *Huffmanella*. Estes autores identificaram dois tipos de ovos: ovos desenvolvidos, constituídos por uma camada interna, clara e fina e uma camada externa, escura e espessa, com opérculos de cor mais clara e com um envelope fino e transparente, de aspeto espinhoso; e ovos menos desenvolvidos (que não contêm larva), com uma parede fina e de cor hialina, envoltos num envelope espinhoso (Huffman & Moravec, 1988).

Posteriormente, foram efetuados vários estudos em que se procedeu à mensuração do tamanho dos ovos, assim como à sua descrição morfológica. A identificação das espécies do género *Huffmanella* passou a ser feita com base nos seguintes critérios:

- 1- Tipo de hospedeiro definitivo
- 2- Identificação do tecido infetado (Moravec & Garibaldi, 2000)
- 3- Dimensão dos ovos
- 4- Aspeto morfológico do ovo
- 5- Características morfológicas do indivíduo adulto (quando presente) (Carballo & Navone, 2007).

Na tabela 2, apresentam-se as espécies de *Huffmanella* spp. identificadas até ao momento, com base nos critérios expostos.

Tabela 2 – Espécies de *Huffmanella* spp. identificadas.

| Espécie | HD | Tecido infetado | Dimensão do ovo (comprimento x largura) (µm) | Caraterísticas morfológicas do ovo | Referência |
|------------------------|-----------|------------------------------------|--|--|---|
| <i>Huffmanella</i> sp. | Teleósteo | Músculo | 113-116x86-87 | Forma elipsoide, opérculos proeminentes, superfície da parede lisa, parede espessa com envelope em forma de concha | Grabda & Slósarczyk, 1981 |
| <i>H. banningi</i> | Teleósteo | Músculo | 99-108x42-45 | Forma oval-elipsoide, opérculos proeminentes e envelope com canais muito pequenos que podem parecer espículas superficiais | Van Banning, 1980; Moravec, 1987 |
| <i>H. carcarhini</i> | Tubarão | Pele e mucosa dos arcos branquiais | 90-105x42-54 | Forma elipsoide, opérculos discretos, superfície da parede lisa ou com pequenas espículas e com envelope em concha | MacCallum, 1925, 1926a; Moravec, 1987 |
| <i>H. huffmanii</i> | Teleósteo | Bexiga natatória | 54-60x30-33 | Forma oval, opérculos proeminentes, superfície da parede lisa e com envelope espinhoso | Huffman & Moravec, 1988; Žďárská Z et al., 2001; Cox et al., 2004 |
| <i>H. schouteni</i> | Teleósteo | Bexiga natatória | 69-75x27-33 | Forma oval alongada, opérculos proeminentes, superfície da parede lisa e com envelope com proeminências | Moravec & Campbell, 1991; Moravec et al., 2003 |
| <i>Huffmanella</i> sp. | Peixe* | Músculo | 67-79x67-79 | Forma oval alongada, opérculos proeminentes, superfície da parede lisa e com envelope salpicado de pontos | Gállego et al., 1993 |
| <i>H. shikokvensis</i> | Teleósteo | Músculo | 78-90x36-45 | Forma oval elipsoide, opérculos proeminentes, superfície da parede lisa e com envelope | Moravec et al., 1998 |
| <i>H. japonica</i> | Teleósteo | Músculo | 58-69x26-30 | Forma oval alongada, opérculos proeminentes, superfície lisa e com envelope transparente de grossura irregular | Moravec et al., 1998 |
| <i>H. paronai</i> | Teleósteo | Epiderme | 48-51x21-24 | Forma oval alongada, opérculos discretos, superfície da parede lisa e com envelope | Moravec & Garibaldi, 2000 |
| <i>H. mexicana</i> | Teleósteo | Bexiga natatória | 63-69x30-33 | Forma oval alongada, opérculos discretos, superfície da parede lisa e sem envelope | Moravec & Fajer-Avila, 2000 |
| <i>H. branchialis</i> | Teleósteo | Brânquias | 45-52x23-30 | Forma oval alongada, com opérculos discretos, superfície da parede lisa e com envelope | Justine, 2004 |
| <i>H. filamentosa</i> | Teleósteo | Brânquias | 48-53x25-30 | Forma oval alongada, opérculos discretos de onde saem finos filamentos e com envelope | Justine, 2004 |
| <i>H. ossicola</i> | Teleósteo | Brânquias | 72-88x32-40 | Forma oval alongada, opérculos discretos, superfície da parede lisa e com envelope preenchido por filamentos | Justine, 2004 |
| <i>H. lata</i> | Tubarão | Pele | 77-88x52-63 | Forma elipsoide, opérculos discretos, superfície da parede espinhosa e sem envelope | Justine, 2005 |
| <i>H. canadensis</i> | Teleósteo | Pele | 50-55x21-27 | Forma oval, opérculos discretos, superfície da parede com riscas transversais e com envelope | Moravec et al., 2005 |
| <i>Huffmanella</i> sp. | Tubarão | Pele | 73-86x39-47 | Forma elipsoide, opérculos discretos, superfície da parede lisa e com envelope | MacLean et al., 2006 |

*Infeção provocada por consumo de peixe

De acordo com os dados recolhidos, verifica-se que a descrição dos ovos encontrados nos tecidos parasitados acaba por ser o fator determinante para a caracterização da espécie. Deste modo, Moravec e Fajer-Avila (2000) adaptaram a chave dicotómica, proposta inicialmente por Huffman e Moravec (1988), para a identificação das espécies de *Huffmanella* spp., que se transcreve.

Chave dicotómica para identificação da espécie de *Huffmanella* spp.

| | | | |
|---|---|---|-----------------------|
| 1 | A | Ovos grandes, com um comprimento de pelo menos 90 μm ; envelope superficial transparente com espinhos; ovos localizados na pele, mucosa dos arcos branquiais ou músculos de peixes marinhos. | 2 |
| | B | Ovos pequenos, excepcionalmente com um comprimento até 90 μm ; envelope superficial transparente com ou sem espinhos; ovos localizados na cavidade abdominal, vísceras ou músculo de peixes marinhos ou de água doce. | 3 |
| 2 | A | Ovos de casca espessa, com espessura de casca que varia entre 6-9 μm ; opérculos proeminentes (12-18 μm); ovos localizados na pele e mucosa que cobre os tecidos conjuntivos dos arcos branquiais de tubarões (<i>Carcharhinus</i>); Oceano Atlântico (U.S.A). | <i>H. carcharhini</i> |
| | B | Ovos de casca fina, com espessura de casca de 3 μm ; opérculos discretos (4-6 μm); ovos localizados na musculatura dos peixes-língua (<i>Cynoglossus</i>), estando concentrados em grupos "black spots"; Oceano Atlântico Ocidental (Senegal, Congo). | <i>H. banningi</i> |
| 3 | A | Ovos pequenos, com um comprimento máximo de 69 μm , opérculos discretos (6-9 μm); envelope superficial transparente com ou sem espinhos; parasita de peixes marinhos ou de água doce. | 4 |
| | B | Ovos maiores que 69 μm ; opérculos grandes, 9-18 μm de largura; envelope superficial transparente sem espinhos; parasitas de peixes marinhos. | 6 |
| 4 | A | Envelope superficial com espinhos; ovos com as dimensões de 54-60x30-39 μm ; ovos localizados na bexiga natatória de peixes de água doce da família <i>Centrarchidae</i> (<i>Lepomis</i> , <i>Ambloplites</i> , <i>Micropterus</i>), U.S.A. (Texas). | <i>H. huffmani</i> |
| | B | Envelope superficial transparente sem espinhos, parasita de peixes marinhos. | 5 |

| | | | |
|---|---|---|---------------------------|
| 5 | A | Envelope superficial bem desenvolvido, de espessura irregular (3-12 μm de espessura); ovos com dimensões de 58-69x26-30 μm ; ovos localizados no músculo de peixes marinhos da família <i>Mullidae</i> (<i>Upenus</i>), estando concentrados em aglomerados "black spots"; Mar Interior do Japão. | <i>H. japonica</i> |
| | B | Envelope superficial pouco desenvolvido, muito fino (cerca de 1 μm), aparentando estar ausente na superfície dos opérculos; ovos com as dimensões de 63-69x30-33 μm ; ovos uniformemente distribuídos na camada da parede da bexiga natatória de peixes da família <i>Tetradontidae</i> (<i>Spherooides</i>); Oceano Pacífico, México. | <i>H. mexicana</i> |

| | | | |
|---|---|---|-------------------------------|
| 6 | A | Ovos estreitos, com dimensões de 69-75x27-30 μm ; opérculos pequenos, 69-75x27-30 μm ; opérculos discretos (6-9 μm); ovos localizados na cobertura serosa do intestino e eventualmente também na cavidade abdominal e fígado de peixes voadores marinhos da família <i>Exocoetidae</i> (<i>Hirundichthys</i> , <i>Cypselurus</i>); Oceano Atlântico Ocidental (Curaçao, Holanda). | <i>H. schouteni</i> |
| | B | Ovos largos, com dimensões de 78-90x36-45 μm ; opérculos proeminentes (15-18 μm); parede dos ovos mais velhos relativamente fina até 3 μm ; ovos localizados na musculatura de peixes marinhos da família <i>Monacanthidae</i> (<i>Stephanolepis</i>), estando uniformemente distribuídos pelos tecidos; Mar Interior do Japão. | <i>H. shikokuensis</i> |

Apesar desta tentativa de organizar conceitos e no fundo simplificar os critérios para a identificação da espécie, estão descritos casos em que os ovos não se enquadram nesta chave dicotómica, como, por exemplo, os ovos encontrados na espécie *Trisopterus luscus*, assinalados por Esteves *et al.* (2009) e os encontrados em *Gymnocranius grandoculis* referidos por Justine (2004).

No que se refere à ultraestrutura dos ovos de *Huffmanella* spp., Žd'árská *et al.* (2001), através das técnicas de microscopia eletrónica de varrimento e de microscopia eletrónica de transmissão, descreveram a constituição da parede destes ovos. De acordo com estes autores, os ovos do género *Huffmanella* são constituídos por três camadas, cada uma composta por várias lâminas de acordo com a representação esquemática que se apresenta.

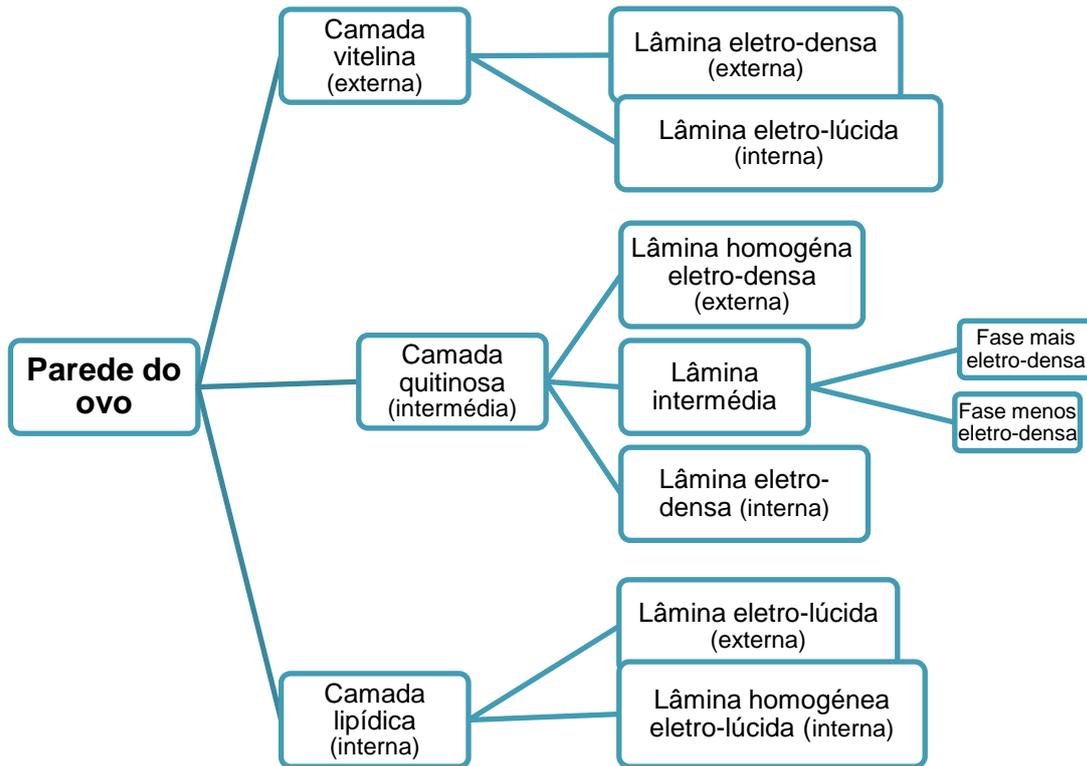


Figura 5 – Representação esquemática da constituição química da parede do ovo de *Huffmanella huffmanii*.

Com o desenvolvimento do ovo, a camada quitinosa e a camada lipídica não sofrem alterações, ao contrário da camada vitelina que, numa primeira fase, é fina e constituída apenas por material eletro-lúcido. À medida que o ovo se desenvolve, na camada vitelina, diferenciam-se duas lâminas, ao mesmo tempo que as projeções superficiais crescem em tamanho e se vão tornando facilmente visíveis ao nível dos opérculos (Žd'árská *et al.*, 2001). A camada quitinosa do ovo vai-se tornando gradualmente mais espessa e escura. Este escurecimento, segundo Cox *et al.* (2004), é atribuído à oxidação de uma substância denominada quitina. No que diz respeito à camada lipídica, esta encontra-se a delimitar todo o ovo incluindo os opérculos, sendo estes formados por uma anel de camada quitinosa. A parte externa do anel é constituída pela camada vitelina e a parte interna pela camada lipídica. Além disto, o opérculo é formado por uma matriz de fibras eletro-lúcidas e eletro-densas (Žd'árská *et al.*, 2001).

O primeiro nematode adulto do género *Huffmanella* foi descrito por Huffman e Moravec (1988), aquando da identificação da espécie *H. huffmanii*. Além desta espécie, também nas espécies *H. canadensis* (Moravec *et al.*, 2005) e *H. moravenci* (Carballo & Navone, 2007) foram descritos indivíduos adultos. Em todos estes trabalhos se conclui que o corpo do nematode é filiforme, sendo o macho, comparativamente à fêmea, mais curto e estreito. De acordo com Huffman e Moravec (1988), o macho possui um comprimento entre 4,69 a 5,14 mm e um diâmetro corporal que varia entre 0,024 a 0,027

mm. Já a fêmea apresenta 4,90 a 7,51 mm e 0,024 a 0,030 mm, respetivamente. Estes indivíduos possuem, de uma forma geral, uma cutícula fina, quase sempre lisa embora às vezes possa ser densa e com uma estriação transversal. Quanto à extremidade cefálica, por norma, é arredondada, relativamente ampla, podendo ter papilas cefálicas indistintas ou presentes. O esófago pode ter um comprimento até 41% do total do corpo do nematode identificando-se na sua porção muscular anterior um estreitamento. Além disso, a rodear o esófago existe um anel nervoso. Neste, também se identificam os cistosomas que possuem núcleos celulares grandes. O poro excretor pode ou não estar presente e, quando presente, localiza-se abaixo do anel nervoso (Huffman & Moravec, 1988). O macho possui um testículo e, entre espécies, distingue-se principalmente pela forma e estrutura da extremidade caudal. Quanto à fêmea possui um único ovário e um útero longo e a distinção entre espécies faz-se pela morfologia do lábio vulvar (Moravec *et al.*, 2005).

O ciclo de vida do parasita *Huffmanella* spp. é desconhecido. Aparentemente, a fêmea adulta deposita os seus ovos no tecido do hospedeiro, num estado muito imaturo e posteriormente, os ovos continuam o seu desenvolvimento (Moravec & Fajer-Avila, 2000). De acordo com Van Banning (1980), a fêmea acaba por sair do tecido e morrer após ovipostura. Gradualmente, os ovos vão-se tornando mais espessos e escuros e a larva acaba por se desenvolver dentro do ovo (Moravec & Garibaldi, 2000). Cox (2004) e Moravec (2000) demonstraram que os ovos de *H. huffmanii*, localizados na bexiga natatória, são libertados no meio ambiente só depois do hospedeiro original ser digerido por um animal piscívoro, conseguindo os ovos passar através da parede do trato intestinal. O mesmo se pode assumir para outras espécies em que os ovos se localizam no tecido muscular e na serosa intestinal. Por outro lado, nas espécies *H. carcharhini* e *H. paronais*, os ovos encontram-se no epitélio branquial de tubarões, o que sugere que os ovos são libertados no ambiente durante a renovação natural das células epiteliais. Como foi demonstrado, em *H. huffmanii*, os ovos livres embrionados não são diretamente infetantes para o hospedeiro, o que conduz à teoria de que talvez estejam envolvidos no ciclo desta espécie, hospedeiros intermediários ou paraténicos (Moravec & Fajer-Avila, 2000). Uma das razões que dificulta o conhecimento do ciclo de vida deste parasita é o facto do indivíduo adulto nem sempre ser observado nos tecidos parasitados. Deste modo, como medida de prevenção, Justine (2011) aponta para a não utilização dos órgãos ou outras partes do corpo dos peixes parasitados na alimentação de peixes de aquacultura.

II. TRABALHO EXPERIMENTAL

1. OBJETIVOS DO TRABALHO

- 1- Estudo da estrutura histológica dos ovos de *Huffmanella* spp.
- 2- Estudo da ultraestrutura dos ovos de *Huffmanella* spp. (por microscopia eletrónica de varrimento)
- 3- Estudo das alterações histológicas no tecido muscular provocadas por este parasita

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

Local e método de captura do pescado

A espécie *Trisopterus luscus* utilizada neste estudo foi capturada no Atlântico Nordeste (FAO). As amostras provêm de duas artes de pesca: artesanal e arrasto. O período de permanência no mar dos dois tipos de embarcações não excede as 24h, estando estas sujeitas ao Plano de Controlo Oficial de Navios (PCON), realizado pelo médico veterinário oficial e que é regido pelo Decreto-Lei nº111/2006 de 9 de junho.

Origem e Identificação

Durante os meses de dezembro de 2011 e janeiro de 2012, no ato de inspeção sanitária na lota da Figueira da Foz, foram recolhidos 10 exemplares de *T. luscus* com lesões eventualmente compatíveis com *Huffmanella* spp., de um total de 45.808,47 kg de pescado inspecionado. Esta rejeição foi baseada na observação de alteração de cor dos exemplares. Estes foram identificados por ordem de recolha em lota, tendo-se procedido ao registo dos parâmetros morfométricos (peso e comprimento) (tabela 3).

Tabela 3 – Registo morfométrico dos exemplares estudados.

| Faneca (nº de ordem) | Peso (g) | Comprimento (cm) |
|----------------------|----------|------------------|
| 1* | 199 | 25,7 |
| 2* | 131 | 21,7 |
| 3* | 231 | 26,7 |
| 4 | 110 | 21,4 |
| 5 | 124 | 23,7 |
| 6 | 122 | 23,4 |
| 7 | 120 | 22,6 |
| 8 | 119 | 22,4 |
| 9 | 121 | 23,0 |
| 10 | 202 | 26,6 |

* Amostra medida e pesada após fixação

2.2 Métodos

Em todas as amostras, procedeu-se ao registo das morfometrias (peso e comprimento). O peso foi registado em gramas e o comprimento até à primeira casa decimal. Os exemplares foram fotografados com recurso a uma máquina digital (Samsung® ES15).

Método de fixação

De modo a inibir a autólise dos tecidos e a preservar os componentes celulares tecidulares, procedeu-se à colocação dos exemplares em formol a 10%. Nesta preparação foi usada água doce da Doca Pesca da Figueira da Foz, na proporção de 9:1 de formaldeído a 37-40%. Após estarem devidamente acondicionadas e rotuladas, as amostras foram transportadas para posterior tratamento histopatológico no Instituto das Pescas e do Mar/Instituto Nacional dos Recursos Biológicos (IPIMAR/INRB).

Estabelecimento dos termos usados na orientação dos animais para descrição das lesões

De modo a clarificar a terminologia utilizada, quer na descrição macroscópica do peixe inteiro ou mesmo na referência à região onde se procedeu à colheita do material para análise histopatológica, segue-se a exemplificação gráfica desses conceitos (figura 6):

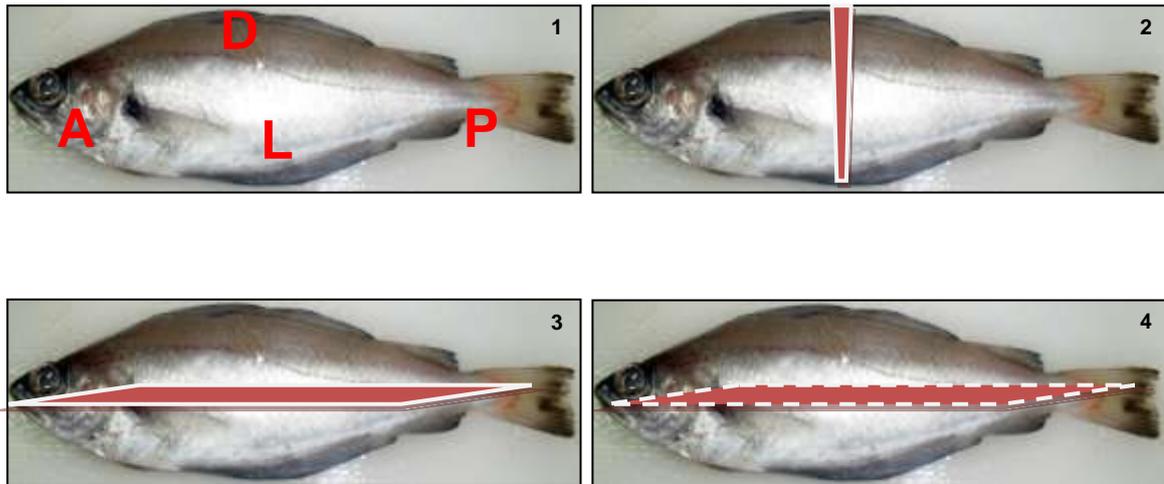


Figura 6- Descrição dos termos usados na orientação dos animais. 1-A- Anterior (região cranial); P- Posterior (região caudal); D- Dorsal (superfície superior do corpo); L- Lateral (superfície do lado direito e esquerdo); 2-Plano transversal que divide o corpo nos quadrantes anterior e posterior; 3-Plano horizontal que separa a musculatura dorsal da musculatura abdominal; 4-Plano sagital que divide o corpo em duas metades iguais (direita e esquerda).

Necrópsia com recolha parasitária

Antes de se proceder à dissecação dos exemplares, observou-se a superfície externa de cada um deles a fim de se proceder à sua classificação, de acordo com a escala de graus de alteração de cor, proposta por Mendes (2006) (tabela 4).

Tabela 4 - Escala de graus de alteração de cor (Mendes, 2006).

| Grau | Caraterísticas |
|------|------------------------------|
| 0 | Ausência de alteração de cor |
| 1 | Alteração de cor ligeira |
| 2 | Alteração de cor moderada |
| 3 | Alteração de cor severa |

Após esta apreciação, os trabalhos decorreram com a seguinte metodologia para exposição da lesão (figura 7):

▪ Material utilizado

- Cabo de bisturi nº4 e lâmina nº21
- Luvas descartáveis
- Pinça de Adson
- Tesoura de Mayo

▪ Metodologia

Para o estudo histopatológico do tecido muscular foram obtidas amostras com aproximadamente 0,5 cm² de cada peixe com distintos graus de cor.

- Com o peixe em decúbito lateral direito, fez-se uma incisão paralela à base da barbatana caudal, no pedúnculo caudal (**linha vermelha**).
- Perpendicularmente, continuou-se essa incisão pelo bordo ventral até ao limite da cavidade visceral (**linha verde**).
- Cuidadosamente, procedeu-se à dissecação, separando a pele da musculatura.

Após exposição da musculatura alterada, procedeu-se à recolha de amostras do músculo da região dorsal.



Figura 7- Representação gráfica das incisões realizadas na necrópsia para recolha de tecido parasitado.

Exame histopatológico

Após a fixação, retiram-se pequenas porções de músculo, para processamento histopatológico. As peças foram colocadas em água destilada, para remover o excesso de formol, e desidratadas, tendo, para esse efeito, sido submetidas a banhos de álcool etílico

p.a. (Merck®) de graduação crescente (50°; 70°; 80°; 95° e 100°), durante períodos de 2h com exceção da passagem em álcool a 95°, onde permaneceram 24h. Após a desidratação das peças, o álcool foi substituído por xilol p.a. (Merck®) durante 1,5 a 2 horas. As peças foram então incluídas em parafina. Os blocos foram cortados num micrótopo Leitz Wetzlar® de carrediça, obtendo-se cortes de 3 µm de espessura, recorrendo-se ao uso de Mollifex® (Gurr, Barral da BDH) para facilitar os cortes. Posteriormente, os tecidos foram colocados em lâminas previamente pinceladas com albumina e colocadas em estufa a 45°C. Após aproximadamente 18h, a desparafinação completou-se com duas passagens em xilol, com a duração de 15 minutos cada. Antes de se proceder à coloração, os cortes foram hidratados, fazendo-os passar por banhos de álcool a 90°, a 70° e água destilada. Na coloração dos cortes usou-se hematoxilina e eosina (H&E), com a seguinte metodologia: Hematoxilina de Harris (Merck®) (2 min), imersão em água destilada, imersão em álcool clorídrico (1 ml de ácido clorídrico fumegante p.a., Merck®, em 99 ml álcool a 70°) seguida da coloração em Eosina Gelbich (Merck®) (1,5 min) e novo processo de desidratação (álcool a 95° e a 100°). Por fim, os cortes permaneceram 10 minutos em xilol. Após remover o excesso de xilol, a montagem das preparações histológicas foi efetuada usando uma gota de Entellan® (Merck®).

Na observação histopatológica, as imagens foram estudadas com recurso a um microscópio ótico (Olympus® BX50F).

Método de contagem dos ovos

Os ovos foram contados nas preparações histológicas, utilizando o microscópio ótico. Esta mensuração foi feita com uma objetiva de (20x) e uma ocular de (10x) com escala, tendo-se procedido depois à conversão em micra. Em cada lâmina foram contados os ovos de cinco campos aleatórios. A partir do número total de ovos obtidos em cada peixe, foi determinado o número médio de ovos por campo, assim como o desvio-padrão para cada um dos 10 exemplares de fanecas.

Medição do ovos

Procedeu-se ao registo do comprimento e da largura de 50 ovos embrionados e 50 ovos imaturos. Para cada tipo de ovo obteve-se a média e o respetivo desvio-padrão do comprimento e largura.

Na contagem dos ovos e na sua medição, usou-se a escala de conversão da tabela 5.

Tabela 5- Escala de conversão.

| Objetiva | Conversão (µm) |
|-----------------|-----------------------|
| 4 | 25 |
| 10 | 10 |
| 20 | 5 |
| 40 | 2,5 |
| 100 | 1 |

Microscopia Eletrónica de Varrimento

Para o estudo das amostras através da microscopia eletrónica de varrimento, recorreu-se ao microscópio eletrónico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. O material usado no estudo da microscopia ótica foi desmontado com o auxílio de xilol. Estas amostras foram depois montadas num suporte de alumínio tendo sido depois estudadas e fotografadas no microscópio eletrónico: SEM/ESEM FEI QUANTA® – 400, com uma aceleração de voltagem de 15 kV.

III. RESULTADOS

1. DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DAS FANECAS AMOSTRADAS

Na amostra estudada, classificaram-se as fanecas da seguinte forma: uma no grau 0, duas no grau 1, quatro no grau 2 e quatro no grau 3. Na tabela 6, apresentam-se as imagens correspondentes a cada grau.

Tabela 6 - Descrição macroscópica e classificação das alterações de cor das fanecas.

| Grau de cor | Fanecas amostradas | Descrição | Nº ordem (faneca) |
|-------------|---|--|-------------------|
| 0 |  | Corpo com cor acastanhada, dorsalmente mais claro, cinzento nos lados e prateado ventralmente | 10 |
| 1 |  | Lesão ligeira de cor negra e não uniformemente distribuída ao longo de toda a musculatura da região dorsal | 4 |
| 2 |  | Lesão moderada de cor negra na musculatura dorsal | 7 |
| 3 |  | Lesão severa de cor negra ao longo de toda a região da musculatura dorsal | 6 |

Após a remoção da pele, constatamos que não havia correspondência entre a intensidade de cor da pele (escala de graus de alteração de cor) e a cor do músculo.

Na tabela 7, apresentam-se os exemplares com maior heterogeneidade de cor.

Tabela 7 - Exemplos de fanecas com grande discrepância entre o grau de alteração de cor atribuído e a intensidade de pigmentação muscular.

| Fanecas amostradas | Descrição | Nº ordem (faneca) |
|---|--|-------------------|
|  | Lesão moderada de cor negra, uniformemente distribuída ao longo da musculatura dorsal (grau 2) | 2 |
|  | Pigmentação intensa, de cor negra e bilateral da musculatura abdominal, sem pigmentação da musculatura dorsal da face esquerda | |
|  | Pigmentação moderada, bilateral, de cor negra, da musculatura dorsal (grau 2) | 8 |
|  | Pigmentação negra evidente na musculatura dorsal e abdominal inferior | |
|  | Pigmentação negra intensa da musculatura dorsal e abdominal sem envolvimento da região caudal | |
|  | Pigmentação ligeira, bilateral, de cor negra da musculatura dorsal (grau 1) | |
|  | Pigmentação negra, bilateral com zonas pouco pigmentadas na musculatura dorsal | |

No exemplar 2, após remoção da pele, verificou-se que a intensidade de coloração do músculo era muito heterogénea. Os músculos dorsais da face esquerda não apresentavam pigmentação e a musculatura abdominal exibia pigmentação moderada.

No exemplar 8, verificou-se que as faces esquerda e direita possuíam uma coloração totalmente distinta, a face esquerda com uma menor intensidade de pigmentação que a face direita.

Quanto ao exemplar 4, a coloração da pele era moderadamente pigmentada, no entanto, a musculatura abdominal apresentava cor negra intensa.

Na figura 8 (A, B,C e D), representam-se em esquema os músculos observados, com alteração de cor:

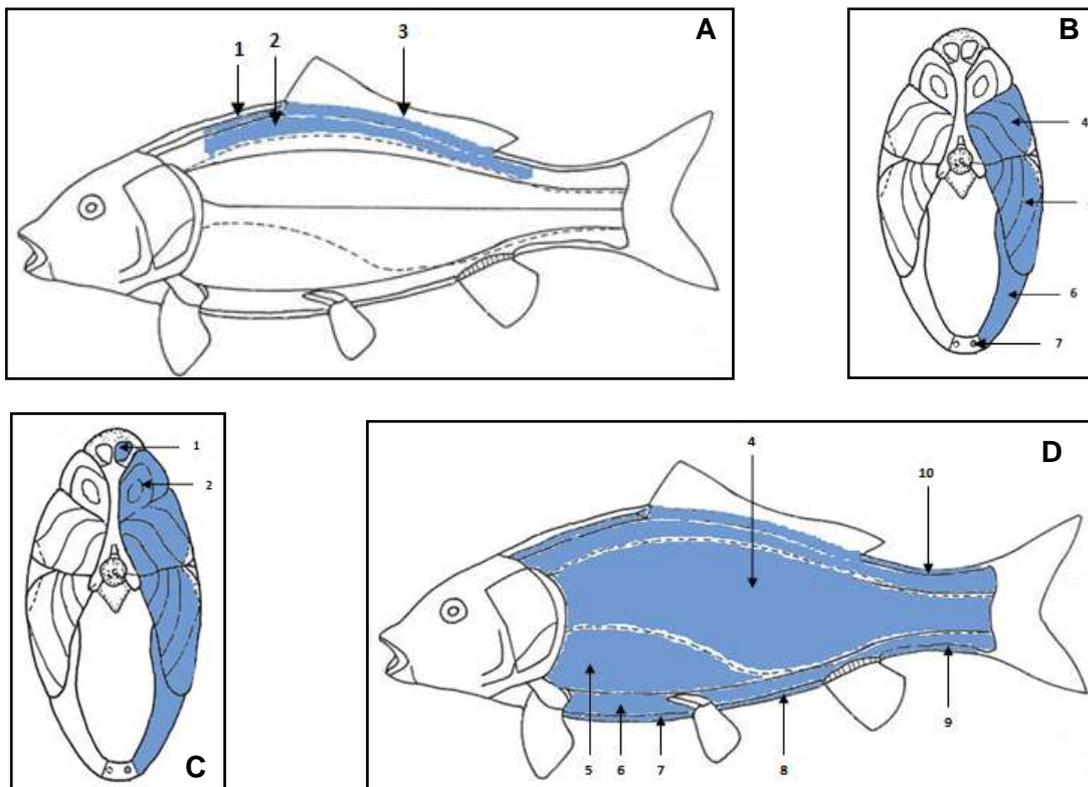


Figura 8- Representação esquemática dos músculos da faneca. (A) Músculo correspondente à região anatómica que aparece com alteração de cor antes da remoção de pele. 1- Músculo supracranial dorsal anterior; 2- Músculo cranial dorsal; 3- Músculo extensor radial da barbatana dorsal e músculo flexor radial da barbatana dorsal. (B) Músculos afetados num estado de menor grau de infeção. 4- Músculo latero-dorsal; 5- Músculo latero-ventral; 6- Músculo cranial ventral; 7- Músculo infracranial ventral anterior. (C) Músculos afetados num grau elevado de infeção. (D) Músculos que podem ser afetados pelo parasita. 8- Músculo infracranial ventral medial; 9- Músculo infracranial ventral posterior; 10- Músculo supracranial dorsal posterior. (Adaptado de Takashima & Hibiya, 1995).

2. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Os músculos dorsais e abdominais constituem a musculatura esquelética dos peixes teleósteos. Nestes músculos as fibras encontram-se dispostas lado a lado e separadas por um septo de tecido conjuntivo, o perimísio. Histologicamente, o músculo é constituído por fibras compostas por um sarcoplasma, miofibrilas, núcleos e um sarcolema. O sarcoplasma preenche o espaço entre as miofibrilas, que têm um papel importante na nutrição muscular assim como na contração. No que se refere ao núcleo, é oval e pode ter diversos tamanhos. A existência de vários núcleos é uma característica, do músculo estriado. A envolver as fibras musculares encontra-se o endomísio que contém fibroblastos e macrófagos residentes que têm um papel fundamental na ação fagocitária nos processos inflamatórios (Takashima & Hibiya, 1995).

Nos cortes histológicos, observou-se a presença de ovos em diferentes estádios de maturação (morulados e com larva) quer dispostos linearmente entre as fibras musculares, quer isolados e dispersos pelo tecido muscular.

Através da observação das figuras 9 a 12, obtidas em cortes longitudinais de músculos com diferentes graus de alteração da cor, foi possível constatar a existência de um número diferente de ovos em cada grau. Esta diferença foi comprovada através das contagens efetuadas de acordo com a metodologia descrita, o que permitiu gradar as nossas observações do modo que descrevemos:

- **Grau 0** – não foram observados ovos
- **Grau 1** – entre 10,4 a 12,6 ovos/campo
- **Grau 2** – entre 11,2 a 25,6 ovos/campo
- **Grau 3** – entre 25,6 a 73,8 ovos/campo



Figura 9 - Músculo de faneca. Corte longitudinal. Sem pigmentação, corresponde ao **grau 0**. H&E, 100x.

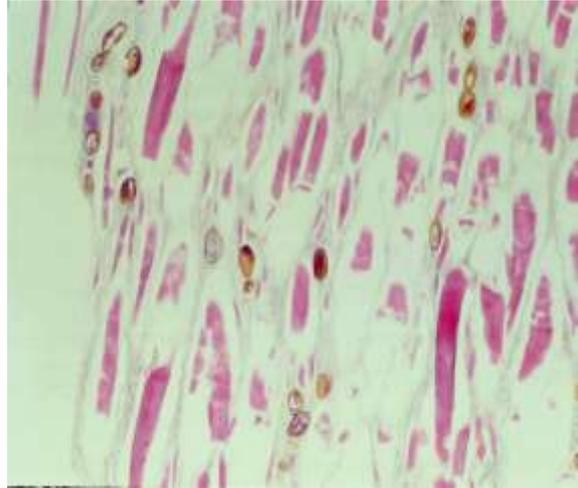


Figura 10 - Músculo de faneca. Corte longitudinal. Intensidade de pigmentação correspondente ao **grau 1**. H&E, 100x.

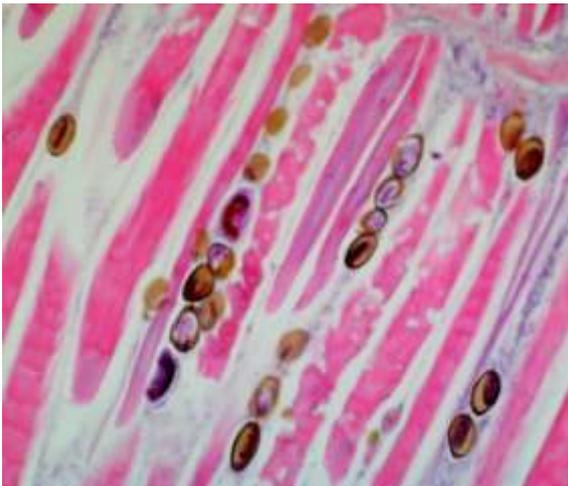


Figura 11 - Músculo de faneca. Corte longitudinal. Intensidade de pigmentação correspondente ao **grau 2**. H&E, 100x.

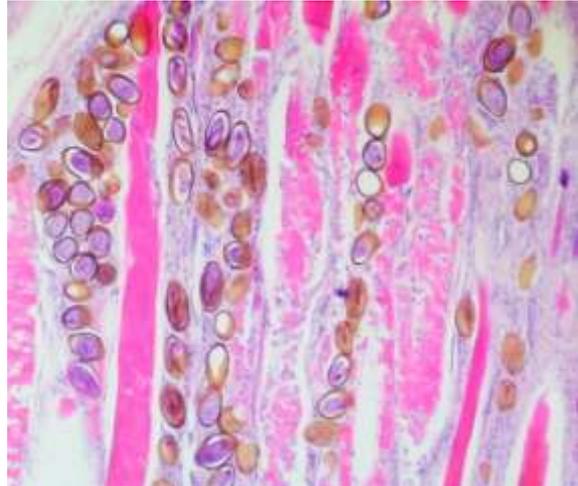


Figura 12 - Músculo de faneca. Corte longitudinal. Intensidade de pigmentação correspondente ao **grau 3**. H&E, 100x.

2.1 Ovos em diferentes estádios de maturação

Ovos imaturos, morulados e com parede hialina:

Na figura 13 (A), observou-se a presença de ovos imaturos, morulados, de parede hialina e conteúdo basófilo, dispostos em aglomerados, junto de ovos de parede de cor castanha com larvas basófilas no seu interior. Na figura 13 (B), os ovos imaturos encontram-se dispostos em fila, entre as fibras musculares. O tamanho deste tipo de ovos foi mensurado e obtiveram-se os seguintes valores:

- comprimento (μm) : 31,87 - 50,93
- largura média (μm): 24,3 – 40,1

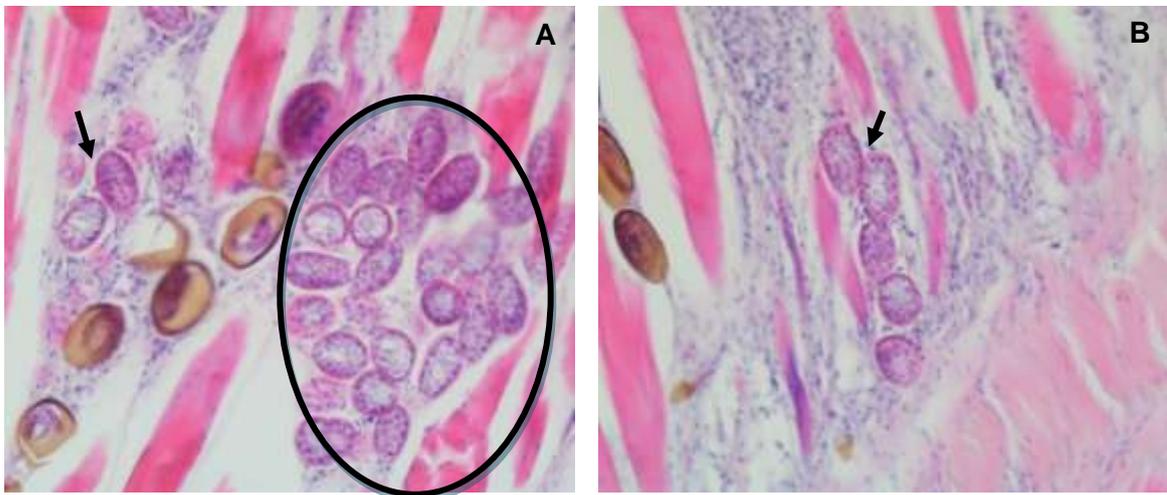


Figura 13 - Músculo de faneca. Corte longitudinal. (A) Aglomerado de ovos imaturos (seta) e (círculo). H&E, 200x; (B) Ovos imaturos dispostos em fila (seta) H&E, 200x.

Ovos embrionados: com parede castanha e morulados:

Na figura 14 (A), encontraram-se ovos de parede castanha, operculados e em diferentes estádios (morulados e com larva). Com maior ampliação (B) podemos observar em maior pormenor a parede assim como o interior de conteúdo morulado basófilo e os dois proeminentes opérculos colocados em posição oposta.

Os ovos embrionados com parede castanha, quer morulados quer com larva visível, foram medidos e incluídos no mesmo grupo. Os valores obtidos foram os seguintes:

- comprimento (μm) : 56,75 – 79,25
- largura média (μm): 27,86 – 48,54

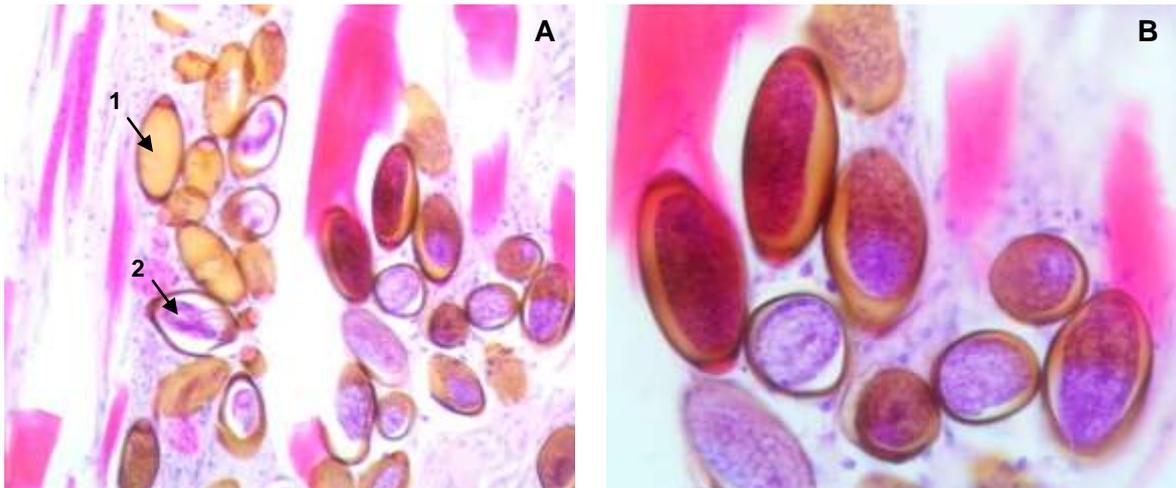


Figura 14 - Músculo de faneca. Corte longitudinal. (A) Ovos castanhos operculados em diferentes estádios de desenvolvimento. H&E, 100x. (1) Ovo com opérculos proeminentes. (2) Ovo embrionado com larva; (B) Ovos castanhos, operculados e morulados. H&E, 400x.

Ovos embrionados: com parede castanha e larva visível

Na figura 15, estão presentes ovos castanhos, bioperculados e embrionados, todos eles no mesmo estágio embrionário. Estes ovos possuem opérculos proeminentes que se localizam em cada um dos polos do ovo, possuindo uma cor mais clara e translúcida relativamente à restante parede que constitui o mesmo.

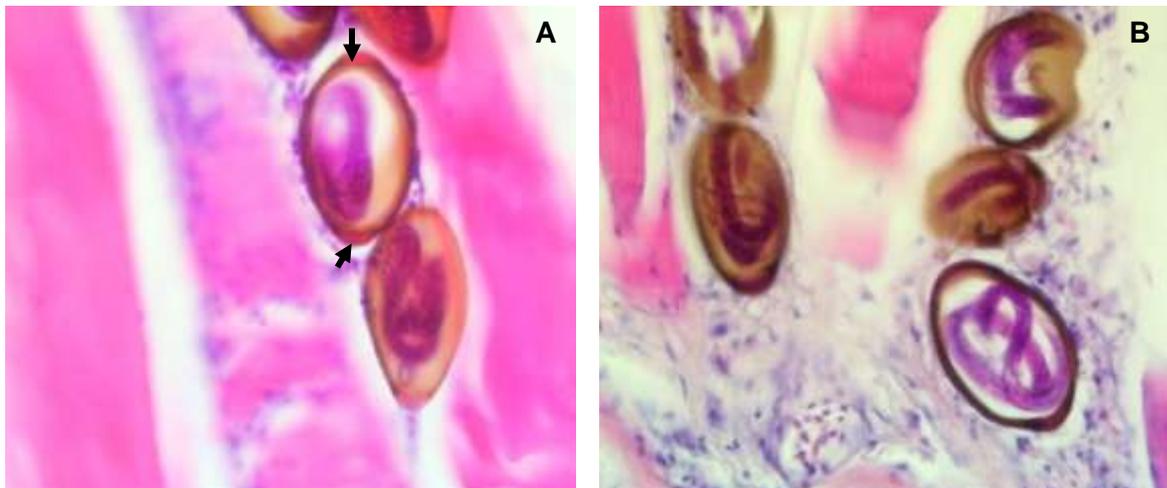


Figura 15 - Músculo de faneca. Corte longitudinal. (A) Ovos com parede castanha, bioperculados (setas) e com larva no interior. H&E, 400x; (B) Ovos de parede castanha e com larva no interior. H&E, 400x.

Ovo com larva em eclosão

Na figura 16, observa-se um ovo castanho embrionado, com opérculos proeminentes e com uma forma larvar a perfurar a sua parede. O ovo encontra-se na região intercelular e a libertação da larva faz-se para este espaço.



Figura 16- Músculo de faneca. Corte longitudinal. Ovo castanho embrionado com larva a perfurar a parede H&E, 400x.

Ovos de tipo aberrante: ovos gigantes, amarelo claro, vazios e com parede normal

Na figura 17, encontra-se um ovo isolado e vazio, com parede castanha com localização intercelular e degenerescência, necrose e infiltrado inflamatório nos tecidos adjacentes. Os ovos vazios como o da figura 17 podem já ter sido ovos embrionados e não apenas uma consequência da infertilidade.

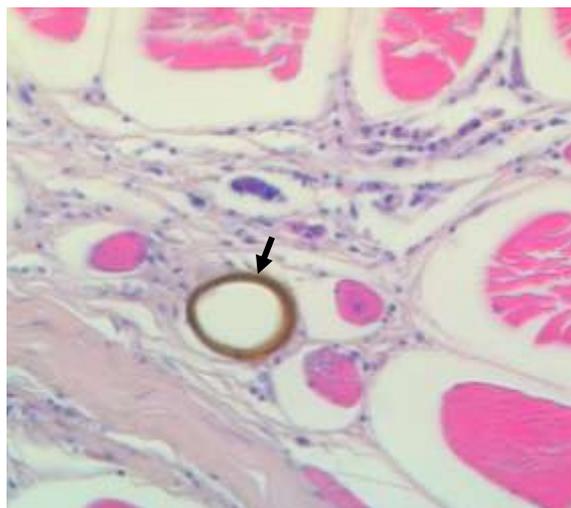


Figura 17 - Músculo de faneca. Corte transversal. Ovo com parede amarela clara e vazio (seta).H&E, 400x.

Nos cortes histológicos efetuados no tecido muscular, observou-se a presença de partes do corpo de um nematode (larva ou adulto) com localização intercelular (A) e intracelular (B) (figura 18).

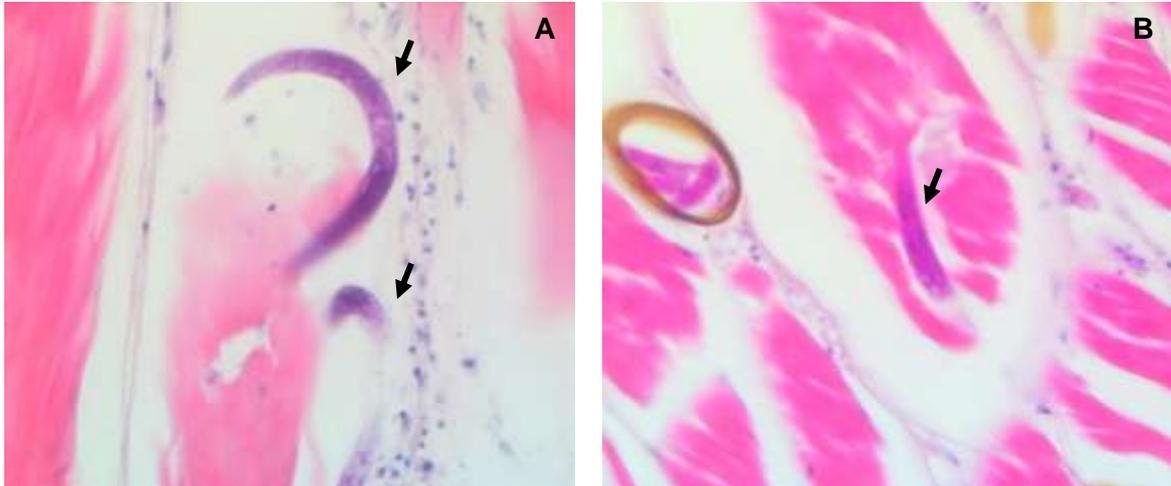
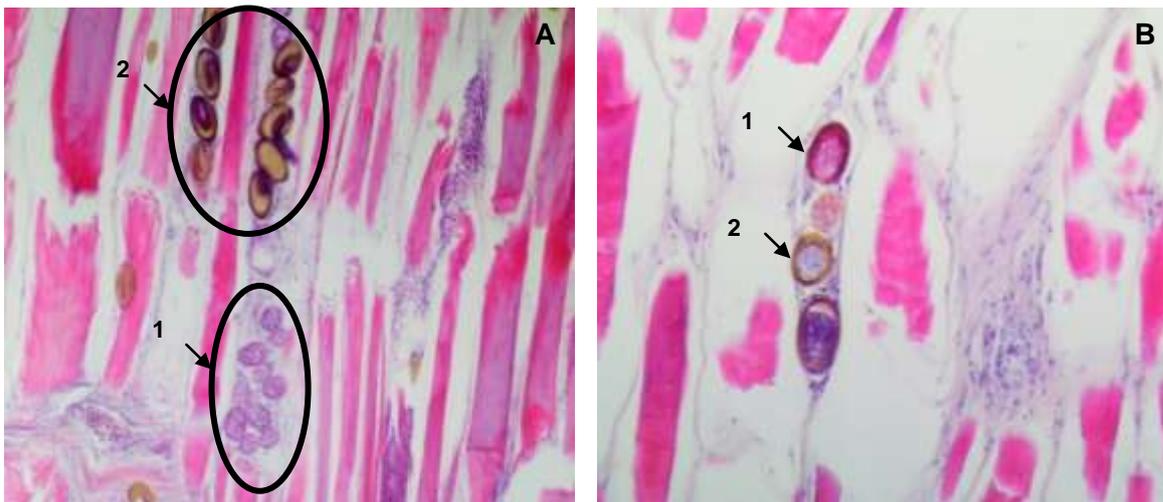


Figura 18 - Músculo de faneca. (A) Corte longitudinal. Parte do corpo de uma larva ou adulto livre no tecido (seta). H&E, 400x; (B) Corte transversal. Parte do corpo de uma larva ou adulto no interior de uma célula muscular (seta). H&E, 400x.

Um aspeto a assinalar é a heterogeneidade na distribuição dos ovos em diferentes estádios de maturação, assim como diferentes intensidades de inflamação, conforme se observa na figura 19.



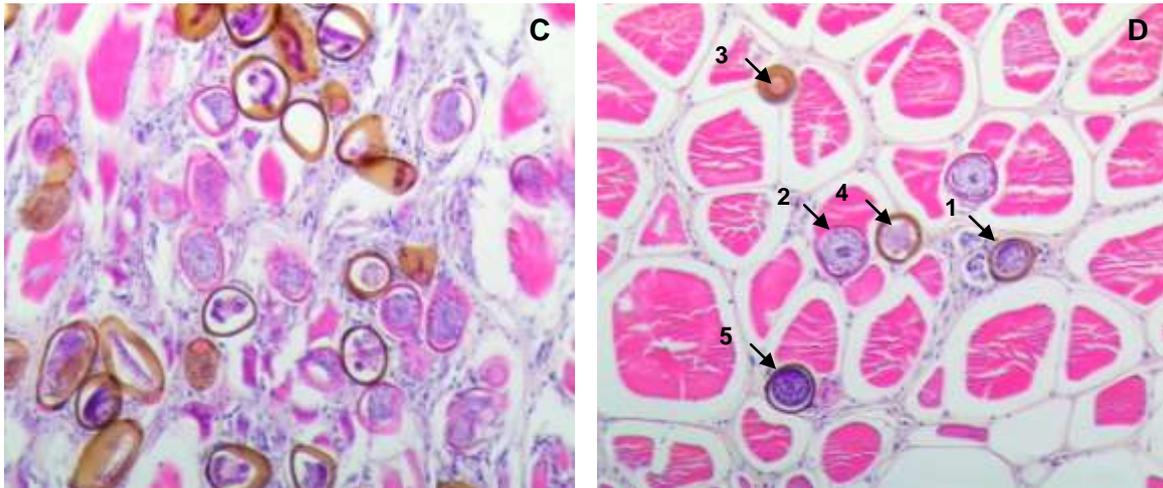


Figura 19 - Músculo de faneca. (A) Corte longitudinal. (1) Ovos, dispostos em fila, do tipo imaturo. (2) Ovos, dispostos em fila, do tipo castanho embrionado H&E, 100x; (B) Corte longitudinal. Ovos castanhos e hialinos do tipo morulado. (1) Ovo hialino morulado. (2) Ovo castanho morulado. H&E, 200x; (C) Corte transversal. Ovos em diferentes estádios de maturação e com intensa inflamação e destruição muscular. H&E, 400x; (D) Corte transversal. Ovos em diferentes localizações. (1) Ovos com localização intercelular. (2) Ovo com localização intracelular. (3) Zona opercular com tonalidade mais clara. (4) Ovo castanho com forma larvar no seu interior. (5) Ovo castanho morulado. Reação inflamatória mínima. H&E, 200x.

Nesta figura, encontramos situações em que ovos imaturos e embrionados se dispõem em fila sem se misturarem, embora partilhem áreas muito próximas (A). Além desta situação, também se encontram ovos dispostos em fila, mas com alternância das suas fases de maturação (B). Nesta imagem, foram fotografados quatro ovos em que a coloração da sua parede é um ponto determinante para a sua distinção (imagem B). A mistura de ovos em estádios de maturação distintos também se encontra bem clara nos cortes transversais apresentados (Figura 19 C e D). Na imagem (D) pode observar-se um ovo imaturo intracelular (2). Na mesma imagem, está presente um ovo cujo corte transversal permite observar o opérculo com cor mais clara (3). Pode ainda observar-se o conteúdo basófilo de cada um dos ovos, sendo possível distinguir a morulação dos ovos imaturos e a presença de uma forma larvar no interior de um ovo castanho embrionado (4). É possível que ovos que apresentam a mesma cor de parede se encontrem em diferentes estádios como se pode observar igualmente na imagem (D) (ovo 4 e ovo 5).

2.2 Alterações musculares

O tecido muscular infetado com formas parasitárias de *Huffmanella* spp., apresenta alterações que estão documentadas na figura 20. Predominam as reações inflamatórias difusas que envolvem os ovos em diferentes estádios de maturação, a degenerescência e a necrose muscular.

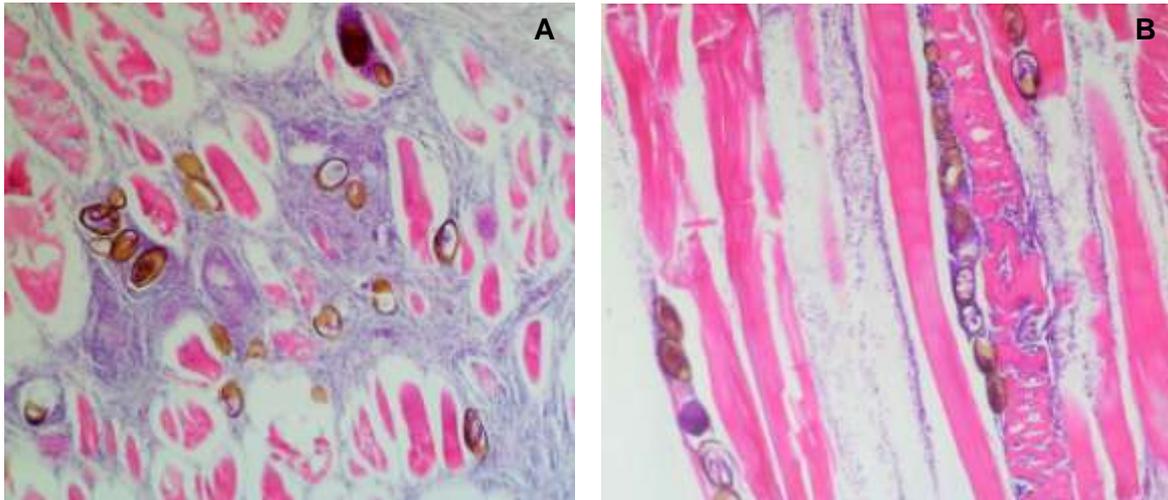


Figura 20- Músculo de faneca. (A) Corte transversal. Reação inflamatória difusa envolvendo ovos em diferentes estádios de maturação. H&E, 100x; (B) Corte longitudinal. Reação inflamatória difusa no perímio, envolvendo ovos em diferentes estádios de maturação. H&E, 100x.

Na reação inflamatória, observamos a presença de macrófagos e outras células mononucleadas difusas (Figura 20 A), ou por vezes com organização em granulomas. Estes caracterizam-se por serem lesões focais, arredondadas, circunscritas e organizadas, constituídos predominantemente por macrófagos (Figura 21).

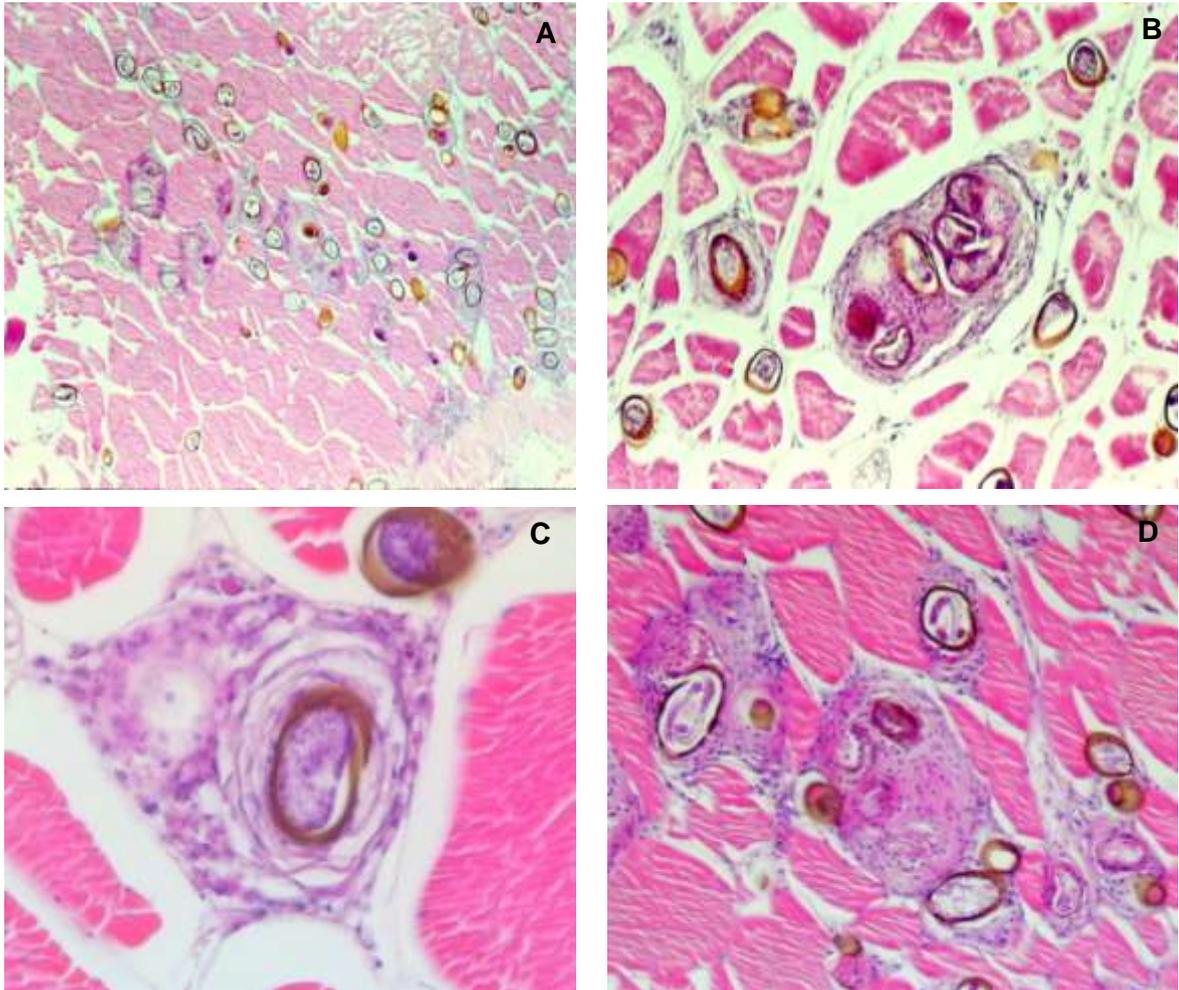


Figura 21 - Músculo de faneca. (A) Corte transversal. Granulomas multifocais. H&E 100x; (B) Corte transversal. Granuloma com 6 ovos no seu interior em diferentes estádios H&E, 100x; (C) Corte transversal. Granuloma com ovo castanho. H&E, 400x; (D) Corte transversal. Granuloma com ovos castanhos e hialinos. H&E, 200x.

Observam-se granulomas multifocais (A), granulomas envolvendo seis ovos, (B), granulomas envolvendo ovos castanhos morulados (C), granulomas envolvendo ovos com larvas e também ovos hialinos (D). Na maioria dos granulomas observados, os ovos são embrionados e têm parede castanha. No entanto, esporadicamente encontraram-se ovos imaturos no centro da lesão (imagem B). Em pormenor (C), observa-se a constituição celular do granuloma, que contém células mononucleares predominantemente macrófagos, linfócitos e plasmócitos em disposição concêntrica e ainda células epitelioides, além do tecido fibroso que delimita toda a reação.

Alterações musculares, como calcificação distrófica, visível na figura 22 (A), hipertrofia e degenerescência das células musculares concomitante com a presença de áreas circulares, de contornos regulares, com espaços vazios no seu interior, semelhantes a vacúolos (B), poderão resultar de locais anteriormente ocupados por ovos.

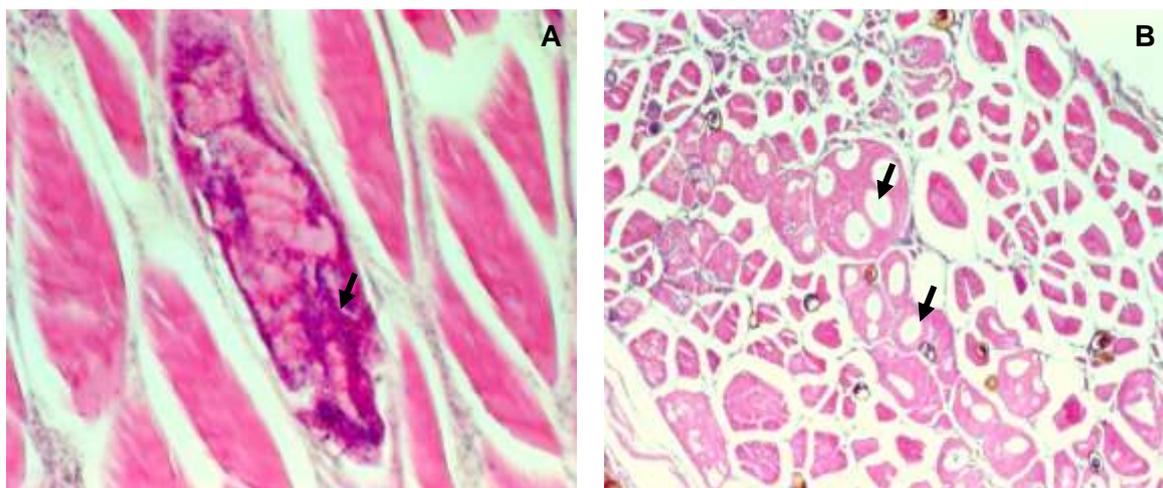


Figura 22 - Músculo da faneca. (A) Corte longitudinal. Calcificação do tecido muscular (seta). H&E, 200x; (B) Corte transversal. Alteração degenerativa com formação de estruturas quísticas de provável natureza parasitária (seta). H&E, 400x.

3. ESTUDO COM RECURSO À MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO

Através da microscopia eletrónica de varrimento (MEV) foi possível observar os ovos dispostos linearmente. Observou-se também que esta disposição topo a topo é assim mantida pela ligação através dos opérculos por um material (não identificado) que os une (tecido unitivo), tal como se observa na figura 23. Estes ovos (A e B) apresentavam cerca de 40 μm de comprimento. Por outro lado, foram igualmente observados ovos isolados (C), maiores que os anteriores, com cerca de 60 μm , ligados à superfície das miofibrilhas.

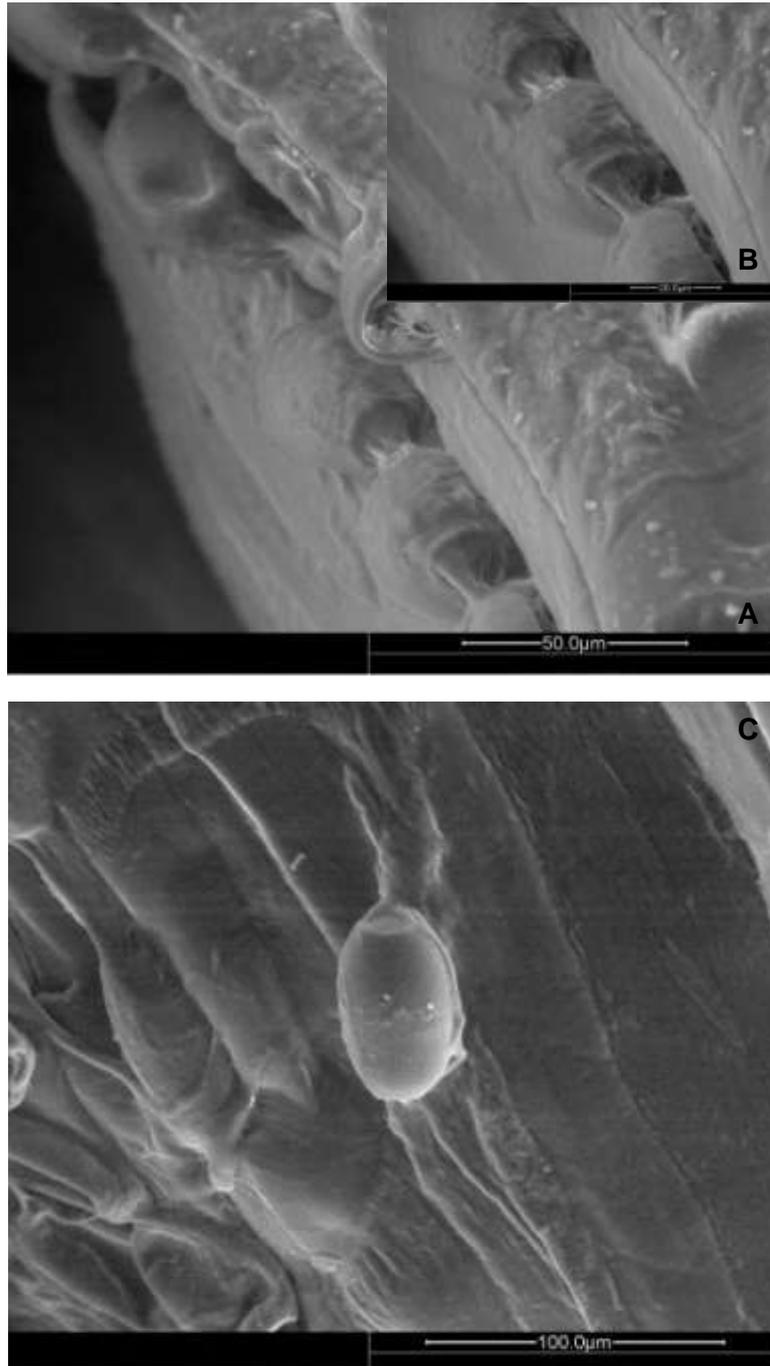


Figura 23 – Músculo da faneca: MEV. (A) Ovos de *Huffmanella* spp. dispostos em fila e unidos pelos opérculos por tecido unitivo. (1500x); (B) Ampliação da imagem anterior (3000x); (C) Ovo de *Huffmanella* spp. à superfície do tecido muscular. Vista geral (1000x).

IV. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi utilizada uma amostra aleatória de dez fanecas, quatro das quais possuíam o tamanho comercial classificado como T3 (150 a 250 g) e as restantes seis foram classificadas com pertencendo ao grupo comercial T4 (50 a 125 g). Os exemplares foram discriminados positivamente (como sendo animais infetados), tendo por base a alteração da cor da pele, de acordo com a escala de classificação do grau de cor, estabelecida por Mendes (2006).

Na avaliação de alteração de cor, verificou-se que apenas quatro exemplares apresentavam semelhança entre o grau de cor atribuído pela observação da pele e a cor do músculo após a remoção daquela. Além de se ter observado que a pele cobria a intensidade de pigmentação do músculo, verificou-se haver heterogeneidade na distribuição da cor deste. No exemplar 8, verificou-se uma assimetria na pigmentação muscular, ao ponto de o lado esquerdo ser classificado como pertencendo ao grau 2 e o lado direito ao grau 3. No que se refere aos exemplares 1, 2 e 3, também, possuíam uma distribuição não uniforme da pigmentação, em que a musculatura dorsal não apresenta alteração de cor, embora a musculatura abdominal possuísse um grau de escurecimento considerável. Este facto pode estar relacionado com o ciclo biológico do parasita, nomeadamente as suas migrações nos tecidos. Segundo Moravec (2000) e Cox (2004), os ovos de *Huffmanella* spp. podem ser ingeridos pelos peixes, através do consumo de espécies de peixes menores, e, posteriormente, ao serem libertados no tubo digestivo, migrarem para os tecidos mais próximos, como a musculatura abdominal, o que poderá explicar o escurecimento da musculatura. Estas fanecas observadas podem encontrar-se nas fases iniciais de infeção.

No que se refere ao peso das fanecas, verificou-se que estas apresentavam um peso médio dentro do intervalo referido, não revelando, por isso, magreza. No entanto, Mendes (2006), após comparar as variáveis, peso observado e peso esperado em função do comprimento, verificou que, regra geral, as fanecas, afetadas por este parasita, apresentavam um peso mais baixo do que o esperado. Estes aspetos, segundo Mendes (2006), são um indicador de que este parasita pode afetar o normal desenvolvimento das fanecas.

No seguimento deste trabalho, tornou-se pertinente o estudo histológico das lesões, uma vez que é importante diferenciar estes casos de outras doenças que provocam o aparecimento de machas negras na pele dos peixes, nomeadamente, lesões melanóticas. O exame histopatológico não revelou a presença de melanina mas, sim,

ovos do nematode em estudo. A causa da pigmentação tecidular, segundo Žd'árská *et al.* (2001), é justificada porque os ovos são depositados, inicialmente, no hospedeiro, com uma parede fina, e, à medida que aumentam o seu tamanho, vão mudando de cor, tornando-se pigmentados. A camada de quitina da casca dos ovos embrionados e maduros vai-se tornando mais espessa e gradualmente passa de incolor a castanha, ou mesmo preta, devido à oxidação da quitina (Cox *et al.*, 2004).

Nas fanecas estudadas, os ovos encontravam-se no tecido muscular tal como em outros casos de infeção por *Huffmanella* spp., registados em peixes teleósteos, nomeadamente no caso de *Huffmanella* sp. (Grabda, 1981), de *H. banningi* (Moravec, 1987), de *H. shikokuensis* (Moravec *et al.*, 1998) e de *Huffmanella* sp. (Esteves *et al.*, 2009). Assim, a nível muscular, os ovos podem encontrar-se dispostos em fila ou aleatoriamente, não existindo nenhum padrão de disposição dos ovos imaturos e embrionados. No caso de infeção por *H. schouteni* num tubarão (Moravec, 2003), foi observado um padrão listado, atribuído à migração das fêmeas pelos tecidos aquando da deposição dos mesmos. No que se refere à localização dos ovos, estes foram encontrados a nível intracelular e intercelular, bem como as formas larvares ou adultas. Moravec *et al.* (1998), relativamente à infeção por *H. shikokuensis*, revelam que as larvas se encontravam também a nível intracelular, embora, depois, as fêmeas só depositassem os ovos a nível intercelular.

No nosso trabalho, o facto de se encontrarem, no mesmo campo, ovos em estádios embrionários diferentes pode estar, segundo Bullard *et al.* (2012), relacionado com a passagem repetitiva da fêmea pelos mesmos locais, o que levaria à mistura de gerações de ovos, pode dever-se à existência de várias fêmeas, a ovos que se desenvolveram com velocidades diferentes, ou, mesmo, dever-se a ovos que não foram fertilizados ou eram inviáveis.

Sabendo-se que uma fêmea do género *Trichuridae* pode pôr entre 5000 a 10000 ovos por dia, Cox *et al.* (2004) estabeleceu que, numa infeção moderada, haveria uma média de 500000 ovos por superfície de peixe enquanto que, numa infeção severa, o número médio de ovos seria à volta de 1 milhão. Neste trabalho, apenas se determinou o número médio de ovos contados por campo, de forma a estabelecer uma relação entre este valor e a correspondência do grau atribuído por avaliação macroscópica. Assim, no grau 1, contaram-se, em média, 11,5 ovos; no grau 2, o número médio de ovos contados foi de 19,6 ovos; e, no grau 3, contaram-se 47,6 ovos. Estes valores médios obtidos permitem justificar alguma facilidade na atribuição do grau 3, visto neste caso possuir o dobro do número médio de ovos obtido no grau 2 e o quádruplo no grau 1, com conseqüente escurecimento proporcional. A dificuldade está em distinguir o grau 1 do

grau 2 e, neste caso, a sua avaliação, após remoção da pele, torna-se essencial, a escala de graus de alteração de cor, proposta por Mendes (2006), é mais precisa após a remoção da pele.

Um critério fundamental para identificação da espécie é a mensuração do tamanho dos ovos assim como a avaliação da sua morfologia. Neste estudo, a medição dos ovos foi feita com as amostras fixadas. Deste modo, obteve-se, para os ovos embrionados, um comprimento que varia entre 56,75 a 79,25 μm e uma largura que pode variar entre 27,86 a 48,54 μm . Analisando as espécies conhecidas até hoje, estes valores não coincidem com nenhuma delas, embora se possa referir que estas dimensões são mais aproximadas das seguintes espécies: *H. ossicola* (72-80 μm x 32-40 μm) (Justine, 2004); *H. balista* (63-78 μm x 32-41 μm) (Justine, 2007); e *H. plectropomi* (64-82 μm / 28-50 μm) (Justine, 2011). Nos ovos imaturos, cujo comprimento variou entre 31,87 a 50,93 μm e a largura entre 24,3 a 40,1 μm , os valores obtidos aproximam-se dos mensurados por Esteves *et al.* (2009). Esteves *et al.* (2009) obtiveram valores de 33,2 a 57,0 μm e 26,1 a 37,7 μm para o comprimento e largura, respetivamente. No que se refere ao aspeto exterior dos ovos observados histologicamente, estes possuem uma forma elipsoide em corte longitudinal e uma forma circular em corte transversal. Como na maioria das espécies do género *Huffmanella* têm também dois opérculos bem definidos e proeminentes, com superfície lisa sem envelope visível. A morfologia observada é muito semelhante à descrita por Esteves *et al.* (2009) num caso de infeção por *Huffmanella* sp. em faneca.

Um aspeto importante é a coloração rosada, característica do opérculo, e que se distingue da coloração castanha do resto do ovo embrionado. Este facto, segundo Žd'árská *et al.* (2001), pode ser devido à ausência de quitina a envolver o opérculo pelo que não ocorre escurecimento da sua parede durante o desenvolvimento. O opérculo é apenas delimitado pela camada vitelina e preenchido por uma matriz de fibras com densidade diferente (Žd'árská *et al.*, 2001).

De acordo com Justine (2011), nos tecidos parasitados, não se encontram apenas ovos com formas comuns, mas também ovos com aspeto anormal e que são classificados como aberrantes, podendo ser de dois tipos: ovos com uma camada espessa e filamentosa e ovos gigantes, amarelos claros, vazios e com superfície lisa. Além destes casos, podem surgir ovos que possuem uma parede com mistura de cor entre âmbar e castanho escuro. Esta situação pode indicar que não houve a normal maturação da cápsula do ovo e uma causa é a morte prematura da larva que se encontra no seu interior (Bullard *et al.*, 2012).

Tratando-se de nematodes histozoicos, com formas migratórias, procuraram-se também alterações do tecido muscular ou respostas celulares à presença do parasita.

Neste caso, observou-se uma reação inflamatória com infiltração celular mononuclear difusa, formação de granulomas e ainda calcificação distrófica. Estas lesões vão de encontro ao descrito por Esteves *et al.* (2009) que, como nós, também encontraram miodegenerescência e necrose. Não observámos no entanto, a fibrose do músculo que estes autores referem (Esteves *et al.* 2009).

Os granulomas formam-se em resposta do organismo à presença de estruturas estranhas de difícil remoção. Um dado importante é que observámos um maior número de granulomas nos peixes cuja classificação corresponde ao grau 2. Este facto pode estar relacionado com uma maior capacidade de resposta do sistema imunitário do hospedeiro, uma vez que, no grau 3, o organismo poderá estar debilitado devido à elevada carga parasitária, ou ainda esta ser uma consequência da diminuição de defesas por outros motivos. Além disso, é de referir que se encontraram granulomas quer contendo ovos castanhos quer ovos imaturos, não pigmentados. Este achado permite-nos chamar à atenção para o facto de, em peixes com uma alteração ligeira da sua cor, poderem existir granulomas parasitários, o que coloca em causa a qualidade para consumo humano deste tipo de alimento. De notar que nas reações granulomatosas encontradas não se verificou nenhuma necrose tecidual em volta dos ovos. Apesar disto, a presença de quistos de provável origem parasitária é indicativa de graves alterações celulares. Quanto à calcificação distrófica encontrada, está relacionada com áreas de necrose muscular, que representam lesão celular e como tal diminuição da qualidade alimentar destes animais.

Sabe-se que a resposta celular do hospedeiro à presença do parasita é tanto mais grave/intensa quanto o número de agentes invasores, assim como a duração do estímulo, dependendo também do local e da fase de migração. Acrescido a isto poderá estar, provavelmente, também, as espécies em causa, referindo-se esta quer em relação ao hospedeiro quer em relação ao parasita.

Neste trabalho, além das larvas livres no tecido, não se encontraram mais formas evoluídas do parasita. A este propósito, Justine (2011) refere que, das 23 espécies de *Huffmanella* spp. conhecidas até ao momento, apenas foi detetada a presença de adultos em seis destas espécies.

O exame histológico permitiu observar a disposição dos ovos em fila, topo a topo e, através da microscopia eletrónica de varrimento, verificou-se que os mesmos se encontravam ligados por um tecido unitivo. Este tecido, provavelmente, altera-se, ou é absorvido, com a libertação dos ovos. Na bibliografia, apenas foi encontrada uma referência à existência de filamentos, aparentemente unindo os opérculos dos ovos entre si, nas espécies *H. filamentosa* e *H. longa* (Justine, 2011). As dimensões registadas nos ovos dispostos em fila e observados isolados corroboram os achados de Moravec e Fajer-

Avila (2000) relativamente ao facto de, aparentemente, as fêmeas depositarem os seus ovos num estágio inicial no tecido do hospedeiro e estes continuarem, depois, o seu desenvolvimento, aumentando de tamanho.

Em Portugal, o registo da presença de *Huffmanella* spp. foi feito pela primeira vez por Mendes (2006) e, mais tarde, revisto por Esteves *et al.* (2009), ambos na faneca. Mendes (2006) também descreve um caso de presença de ovos de *Huffmanella* spp. nas brânquias de *Sphyrna lewini*, embora não tenha representatividade do ponto de vista da saúde pública dado se tratar de um animal em cativeiro e não possuir como *habitat* natural as águas da costa Portuguesa. De referir que, no Oceano Atlântico, o parasita *Huffmanella* spp. foi descrito em três espécies diferentes: *Carcharhinus commersoni* (MacCallum, 1925, 1926a; Moravec, 1987); *Cynoglossus browniv* (Van Banning, 1980; Moravec, 1987) e *Trisopterus luscus* (Esteves *et al.*, 2009). No caso concreto das fanecas parasitadas pelo nematode do género *Huffmanella*, a sua rejeição é devida ao facto de estas apresentarem manchas negras difusas pelo músculo, o que lhes dá um aspeto repugnante (Mendes, 2006). Contrariamente, outras espécies de peixes teleósteos, como *Nemipterus furcosus*, *Gymnocranius grandoculis* e *Bodianus loxozonus*, parasitados por *H. brachialis*, *H. filamentosa* e *H. ossicola*, respetivamente, cujo local de infeção são as brânquias, não representam preocupação do ponto de vista de saúde pública, dado que é habitual proceder ao descabeçamento e evisceração do peixe antes do seu consumo. Embora os parasitas do género *Huffmanella* não sejam referenciados como antropozoonóticos, existe um caso descrito, em Palma de Maiorca, de uma criança infetada com ovos de *Huffmanella* spp. através do consumo de peixe. Clinicamente, a criança apresentou episódios diarreicos, e após análise fecal, foi confirmado o diagnóstico desta parasitose (Gállego *et al.*, 1993).

Um caso particular descrito por MacLean *et al.* (2006) expõe o sucesso no tratamento de uma infeção por *Huffmanella* com recurso à administração de levamisol. O caso clínico refere-se a uma fêmea da espécie *Carcharhinus plumbeus*, com 6,3 kg, e que se encontrava em cativeiro num aquário na Carolina do Norte. O autor refere que, após 41 dias de administrações seriadas de levamisol (10mg/kg. IM), ocorreu a remissão total destas lesões assim como, microscopicamente, houve uma redução significativa no número de ovos depositados nos tecidos, que então se apresentavam inviáveis. No caso concreto da espécie estudada, *Trisopterus luscus*, o seu tratamento é inviável visto ser um peixe teleósteo do meio natural. No entanto, há espécies usadas em aquacultura e parasitadas pelo género *Huffmanella*, como é o caso da espécie *Plectropomus leopardos* (Justine, 2011), usada em aquacultura no continente asiático, e da espécie *Sphoeroides annulatus* (Moravec & Fajer-Avila, 2000), utilizada em aquacultura no México. Deste

modo, é importante conhecer a ação patogénica do parasita, nestas espécies no meio natural, para controlar situações de infeção quando em cativeiro. Além disso, é importante conhecer até que ponto o fármaco utilizado se aplica neste tipo de situação.

A questão da infeção parasitária do peixe constitui um problema para a indústria pesqueira. Tomando como exemplos a infeção por nematode, no caso de infeções por larvas de anisacídeos, *Anisakis s. l.*, a sua presença na cavidade abdominal e no músculo pode conduzir à rejeição do peixe. Na infeção por *Huffmanella* spp., a rejeição do peixe não se deve à visualização direta do parasita, mas à alteração da cor do músculo que o torna repugnante. Uma outra vertente do problema é o facto de a infeção por alguns parasitas, como *Anisakis*, ter associado um risco potencial para a saúde dos consumidores, uma vez que estes podem ser infetados pela ingestão de peixe cru ou pouco cozinhado, contendo a larva viva, mas também porque os produtos de secreção/excreção parasitária e proteínas somáticas podem causar reações alérgicas (EFSA, 2010). A congelação (a -20°C durante, no mínimo, 24h, ou a -35°C durante, no mínimo, 15h – anexo do regulamento (UE) nº 1276/2011 da Comissão de 8 de Dezembro de 2011) inviabiliza as larvas de *Anisakis* e, nesse caso, o peixe parasitado não representa risco de infeção ou alergia para o consumidor. No entanto, a presença de *Anisakis* foi detetada por imuno-histoquímica no músculo de peixes, em áreas próximas da larva e onde a estrutura do sarcómero se mantinha íntegra, indicando que os tais alérgenos estão dispersos no músculo e podem causar sintomas alérgicos (Solas *et al.*, 2008). No caso da infeção por *Huffmanella* spp., não são conhecidos estudos sobre o potencial alérgico destes nematodes histozoicos, pelo que, embora o peixe com alteração de cor seja retirado do circuito comercial, a utilização das fanecas parasitadas como subproduto pode ser questionável.

É importante referir que, em 2 meses de estágio na lota da Figueira da Foz, foram rejeitadas apenas 10 fanecas devido a alteração da sua cor. Este facto pode dever-se à pré-seleção que os pescadores fazem no momento de separação das espécies ainda em alto mar. Sendo assim, os pescadores voltam a lançar ao mar as fanecas que, aparentemente, apresentam uma alteração da sua cor, podendo contribuir para potenciar o ciclo biológico do parasita, além de impedir uma avaliação real do impacto desta parasitose nesta espécie de peixe com grande importância comercial no nosso país.

V. CONCLUSÃO

A elaboração deste trabalho permitiu obter mais conhecimento sobre o parasita do género *Huffmanella*, responsável pela alteração da musculatura (dorsal e abdominal) da faneca.

Embora o ciclo biológico do parasita permaneça desconhecido, neste estudo, verificou-se que a infeção parasitária se inicia nos músculos da região abdominal, expandindo-se depois à musculatura dorsal.

O estudo histopatológico permitiu descrever os diferentes tipos de ovos (imaturos e embrionados), a sua disposição ou localização no tecido muscular, estabelecer uma relação entre o número de ovos castanhos embrionados e o grau de alteração de cor do peixe e ainda, identificar as reações tecidulares provocadas pela presença dos mesmos. O estudo da ultraestrutura, recorrendo à MEV, permitiu verificar que os ovos na postura são colocados em fila (topo a topo) e se encontram ligados pelos opérculos por um tecido que desaparece à medida que os ovos se desenvolvem.

Finalmente, é importante realçar o papel do veterinário oficial no desempenho das suas funções de Inspeção Sanitária, no sentido de não permitir o circuito comercial destes animais, uma vez que as consequências não estão de todo esclarecidas.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Bamber RN, Glover R, Henderson PA & Turnpenny AWH. Diplostomiasis in the sand smelt, *Atherina presbyter* (Cuvier), population at Fawley Power Station. *J. Fish Biol.* 1983;23:201-210.
2. Bruno DW, Poppe TT. Autopsy Procedures. In: *A Colour Atlas of Salmonid Diseases* (ed. by D.W. Bruno & T.T. Poppe). Academic Press, San Diego, CA. 1996;11-19.
3. Bullard SA, Ruiz CF, McElwain, Murray MJ, Borucinska JD, Benz GW. *Huffmanella* cf. *carcharhini* (Nematoda: Trichosomoididae: *Huffmanellinae*) from skin of a sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in the Pacific Ocean. *The Journal of Parasitology.* 2012;98(2):333-40.
4. Carrapato H. Produtos da Pesca. Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica. Publicações Avulsas do Instituto Nacional de Investigação das Pescas e do Mar, 2002;p292.
5. Carballo MC, Navone GT. A new *Huffmanella* species (Nematoda: Trichosomoididae) parasitizing atherinid fishes in North Patagonian Gulfs, Argentina. *The Journal of Parasitology.*2007;93:377-382.
6. Cox MK, Huffman DG, Moravec F. Observations on the distribution and biology of *Huffmanella huffmanii* (Nematoda: Trichosomoididae). *Folia Parasitologica.*2004;51:50-54.
7. Decreto-Lei nº 111/2006 de 9 de junho. *Diário da República nº 112 série I-A.* Ministério da Agricultura Pescas e Alimentação. Lisboa.
8. Dias A, *Biologia Pesqueira.* Universidade do Algarve-Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente. 2007/2008.
9. Eiras JC. Unusual attachment sites of the parasitic copepod *Lernaeocera lusci* (BASSET-SMITH, 1896) upon *Trisopterus luscus* L. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 1984;4: 28-29.
10. Eiras JC. Some aspects of the infection of bib, *Trisopterus luscus* (L.), by the parasitic copepod *Lernaeocera lusci* (BASSET-SMITH, 1896) in Portuguese waters. *J. Fish Biol.*, 1986;28:141-145.
11. EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal.* 2010: 8(4): 1543. Doi: 10.2903/j.efsav.2010.1543
12. Esteves A, Seixas F, Carvalho S, Nazário N, Mendes M, Martins C. *Huffmanella* sp. (Nematoda: Trichosomoididae) muscular parasite from *Trisopterus luscus* captured off the Portuguese coast. *Diseases of Aquatic Organisms.*2009;84:251-255.
13. Evans NA, Whitfield PJ, Bamber RN & Espin PM. *Lernaeocera lusci* (Copepoda: Pennellidae) on bib (*Trisopterus luscus*) from Southampton Water. *Parasitology.* 1983; 86:161-173.

14. Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2011. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version
15. Gállego J, Riera C, Portús M. *Huffmanella* sp. eggs (Nematoda: Trichosomoididae), as a human spurious parasite in a child from Barcelona (Spain). *Folia Parasitologica*. 1993;40:208-210.
16. Gestal C & Azevedo C. Ultrastructural aspects of hepatic coccidiosis caused by *Goussia lusca* n. sp. (Apicomplexa: Coccidia) infecting *Trisopterus luscus* (Gadidae) from the NE Atlantic Ocean. *Dis Aquat Org*. 2006;71:25-31.
17. Grabda J, & ślósarczyk W. Parasites of marine fishes from New Zealand. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 1981;11:85–103.
18. Huffman DG & Moravec F. First description of adult *Huffmanella huffmanii* Moravec, 1987 (Nematoda: Trichosomoididae) from the swimbladder of centrarchid fishes of the upper San Marcos River, Central Texas. *Folia Parasitologica*. 1988;35:227-234.
19. Justine J-L. Three new species of *Huffmanella* Moravec, 1987 (Nematoda: Trichosomoididae) from the gills of marine fish off New Caledonia. *Systematic Parasitology*. 2004;59:29-37.
20. Justine J-L. *Huffmanella lata* n. sp. (Nematoda: Trichosomoididae: Huffmanellinae) from the shark *Carcharhinus amblyrhynchos* (Elasmobranchii: Carcharhinidae) off New Caledonia. *Systematic Parasitology*. 2005;61:181-184.
21. Justine, J-L. *Huffmanella plectropomi* n. sp. (Nematoda: Trichosomoididae: Huffmanellinae) from the coral grouper *Plectropomus leopardus* (Lacépède) off New Caledonia. *Systematic Parasitology*. 2011;79:139-143.
22. Justine J-L. *Huffmanella* spp. (Nematoda, Trichosomoididae) parasites in coral fishes off New Caledonia, with descriptions of *H. balista* n. sp. and *H. longa* n. sp. *Zootaxa*. 2007; 1628:23–41.
23. Llewellyn, J & Green, JE. Host-Specificity and Speciation in Diclidophoran (Monogenean) Gill Parasites of Trisopteran (Gadoid) Fishes at Plymouth. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 1980;60:73-79.
24. Maccallum GA.. Eggs of a new species of nematoid worm from a shark. *Proceedings of the United States National Museum*. 1925; 67: 1–2.
25. Machado MMG. Contribuição para o Estudo do Stock de *Trisopterus luscus* da costa Portuguesa, Instituto Nacional de Investigação das Pescas e do Mar, 1983;104.
26. MacLean RA, Fatzinger MH, Woolard KD, Harms CA. Clearance of a dermal *Huffmanella* sp. in a sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*) using levamisol. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2006;73:83-88.
27. Mendes M, Madeira de Carvalho LM, Ramos P, Fazendeiro I, Afonso-Roque MM. Presence of *Huffmanella* eggs (Nematoda, Trichosomoididae) in the faneca muscle - *Trisopterus luscus* (Linnaeus, 1758) of the coast of Portugal. [Paper presented at the IX Congresso Ibérico de Parasitologia, 25-28 October 2005, Coimbra, Portugal.] *Acta Parasitológica Portuguesa*. 2005;12,334.

28. Mendes M. *Huffmanella* sp. (Nematoda, *Trichosomoididae*) parasita muscular da faneca – *Trisopterus luscus* (Linnaeus, 1758) – na Costa Portuguesa. Tese de mestrado. Universidade Técnica de Lisboa.2006;Pp.134
29. Menezes J. Manual sobre Doenças de Peixes Ósseo. In: Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, eds. 2000; 214p.
30. Moravec F, Campbell BG. A new *Huffmanella* species, *H. schouteni* sp. N. (Nematoda: *Trichosomoididae*) from flying fishes in Curaçao. *Folia Parasitologica*.1991;38:29-32.
31. Moravec F, Conboy GA, Speare D. A new trichosomoidid from the skin of *Sebastes* spp. (Pisces) from British Columbia, Canada. *The Journal of Parasitology*.2005; 91:411-414.
32. Moravec F, Fajer-Avila E. *Huffmanella mexicana* N. Sp. (Nematoda: *Trichosomoididae*) from the marine fish *Sphoeroides annulatus* in Mexico. *The Journal of Parasitology*. 2000;86:1229-1231.
33. Moravec F, Garibaldi F. *Huffmanella paronai* sp. N. (Nematoda: *Trichosomoididae*), a new parasite from the skin of swordfish *Xiphias gladius* in the Ligurian Sea (Western Mediterranean).*Folia Parasitologica*.2000;47:309-313.
34. Moravec F, Garibaldi F. First record of *Huffmanella schouteni* (Nematoda: *Trichosomoididae*), a histozoic parasite of flyingfishes, in Europe.2003;57:173-175.
35. Moravec F, Koudela B, Ogawa K, Nagasawa K. Two new *Huffmanella* species, *H. japonica* n. sp. and *Shikokuensis* n. sp.(Nematoda: *Trichosomoididae*), from marine fishes in Japan. *The Journal of Parasitology*. 1998;84(3): 589-593.
36. Moravec F. Revision of Capillariid nematodes (subfamily *Capillariinae*) parasitic in fishes. *Studie ČSAV*. 1987; N° 3, *Academia*, Praha, 141 p.
37. Moravec F & Justine J-L. Some trichinelloid nematodes from marine fishes off New Caledonia, including description of *Pseudocapillaria novaecaledoniensis* sp. Nov. (*Capillariidae*). *Acta parasitologica*. 2010;55:71-80.
38. Nunes ML, Batista I, Bandarra NM, Morais MG, Rodrigues PO. Produtos da Pesca: Valor Nutricional e Importância para a Saúde e Bem-estar dos Consumidores. Publicações Avulsas do Instituto Nacional de Investigação das Pescas. 2008;77p.
39. Petter AJ & Cabaret J. Ascaridoid Nematodes of Teleostean Fishes from the Eastern North Atlantic and Seas of the North of Europe. *Parasite*. 1995; 2: 217-230.
40. Portaria nº559/76 de 7 de Setembro. *Diário da República nº 210 série I*. Ministério da Agricultura Pescas e Alimentação. Lisboa.
41. Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia nº L 139*. Comunidade Europeia. Estrasburgo.

42. Regulamento (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia nº L 226*. Comunidade Europeia. Bruxelas.
43. Regulamento (CE) nº 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. *Jornal Oficial nº L 139*. Comunidade Europeia. Bruxelas.
44. Regulamento (CE) nº1276/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Dezembro de 2011. *Jornal Oficial nº L 327*. Comunidade Europeia. Bruxelas.
45. Regulamento (CE) nº2074/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 5 de Dezembro de 2005. *Jornal Oficial nº L 338*. Comunidade Europeia. Bruxelas.
46. Regulamento (CE) nº2406/96 do Parlamento Europeu e do Conselho de 26 de Novembro de 1996. *Jornal Oficial nº L 334*. Comunidade Europeia. Bruxelas.
47. Rellot FJ, Valero A & Adroher FJ. Anisakid parasites of the pouting (*Trisopterus luscus*) from the Cantabrian Sea coast, Bay of Biscay, Spain. *Journal of Helminthology*. 2008;82: 287-291.
48. Sanches J G. Guia para Identificação do Pescado de Portugal Submetido a Tamanho Mínimo de Captura. Publicações Avulsas do Instituto Nacional de Investigação das Pescas e do Mar. 1992:p61.
49. Santos PT. Análise de Parâmetros relativos à Biologia e Pesca de Faneca, *Trisopterus luscus* L, de 1983-1988. In:Colóquio "Conservação do Recursos Vivos Marinhos" INIP, Lisboa, 25-27 de Set. 1989;229-242.
50. Sobral MPC. Aspectos Relativos à Biologia e Pesca de *Trisopterus luscus* L, Seminário de 5º ano em Biologia. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 1983:72p.
51. Solas, MT, Garcia ML, De las Meras C, Rodríguez-Mahillo AI, Gonzáles-Muñoz M, Moneo I, Mendizabel A, Tejada M.2009. Anisakis sim lea antigens in fresh and frozen-thawed muscle of anchovies in vinegar. *Food SC. Tech. Int.*15:139-148.
52. Svetovidov AN. Gadidae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E, eds. *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Unesco. 1986;693-694.
53. Takashima F & Hibiya T. An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features.Kodansha Ltd. 1995;195:24-29
54. Tirard C, Thomas F, Raibaut A & Renaud F. The distribution and abundance of *Lernaeocera lusci* (Copepoda) on hake (*merluccius merluccius*) and bib (*Trisopterus luscus*) (Teleostei). *International Journal for Parasitology*. 1996;26:1387-1392.
55. Torre Molina R, Aparicio JP, Bienes MH, Pérez RJ, Ruso AM & Franco EM. Anisakiasis en pescados frescos comercializados en el norte de Córdoba. *Rev Esp Salud Pública*. 2000;74:517-526.
56. Whittington ID & Kearn G. Rapid Hatching of Mechanically-Disturbed Eggs of the Monogenean Gill Parasite *Diclidophora luscae*, with Observations on

- Sedimentation of Egg Bundles. *International Journal for Parasitology*. 1988;18:847-852.
57. Van banning P. The occurrence of black spots in the tongue sole, *Cynoglossus browni* Chabanaud, due to nematode eggs (*Capillaria spinosa*) previously in the shark *Carcharhinus milberti* Muller and Henle. *Journal of Fish Biology*. 1980;17:305–309.
58. Van Damme PA, Hamerlynck O & Ollevier F. The population dynamics of the parasitic copepode *Lernaecera lusci* (Bassett-Smith, 1896) on its definitive host. *Biologische Anstalt Helgoland*. 1996;50:191-203
59. Van Den Broek WLF. Infection of estuarine fish populations by *Cryptocotyle lingua* (Creplin). *J. Fish Biol*. 1979;14:395-402.
60. Van Damme PA & Ollevier F. Morphological and Morphometric Study of Crustacean parasites within the Genus *Lernaecera*. *International Journal for Parasitology*. 1995;25:1401-1411.
61. Verneau O, Bentz S, Sinnappah ND, Preez L, Whittington I & Combes C. A view of early vertebrate evolution inferred from the phylogeny of polystome parasites (Monogenea: Polystomatidae). *Proc. R. Soc. Lond. B*. 2002;269:535-543.
62. Žd'árská Z, Huffman DG, Moravec F, Nebesářová J. Egg shell ultrastructure of the fish nematode *Huffmanella huffmanii* (Trichosomoididae). *Folia Parasitologica*. 2001;48:231-234.

VII. ANEXOS

Dado que o ato de inspeção sanitária teve um papel determinante na obtenção das amostras de faneca para realização do presente estudo, torna-se pertinente o seu enquadramento.

Assim, durante a minha permanência na lota da Figueira da Foz, foram inspecionados em dezembro, 716555,2 Kg de pescado, o dobro da quantidade de pescado inspecionado em janeiro (gráfico1).

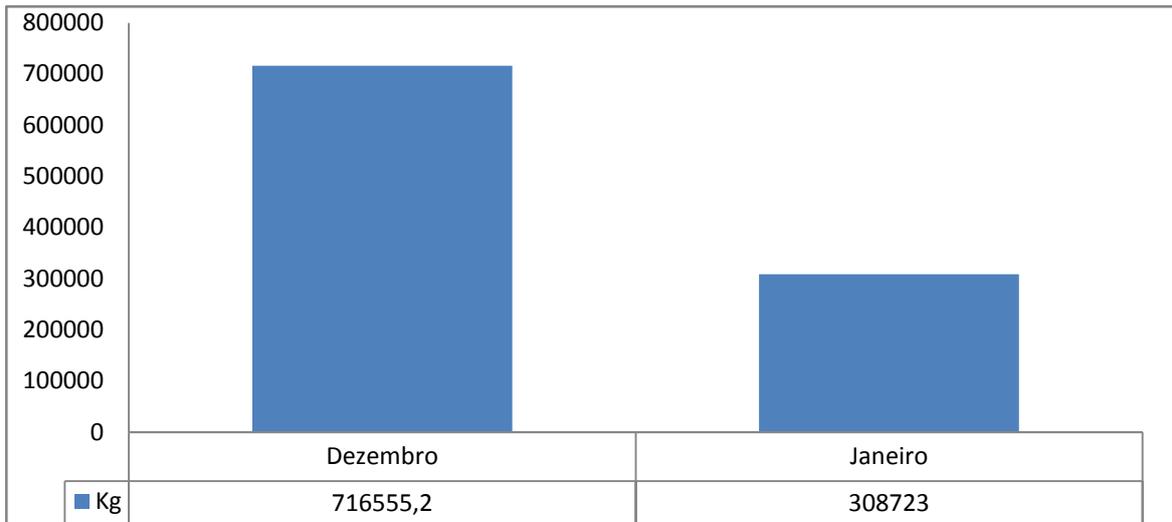


Gráfico 1 - Quantidade de pescado vendido na lota da Figueira da Foz durante o período de estágio.

Nos gráficos 2 e 3, apresentam-se as espécies de pescado com maior representatividade na lota nos meses referidos.

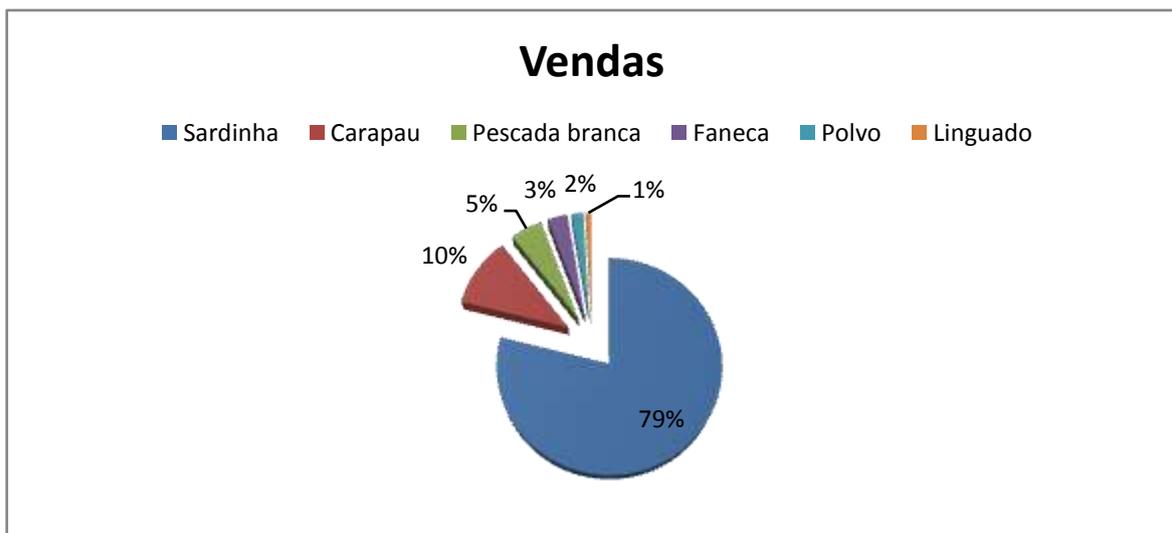


Gráfico 2 - Espécies mais vendidas (mais de 5000 Kg) no mês de dezembro.

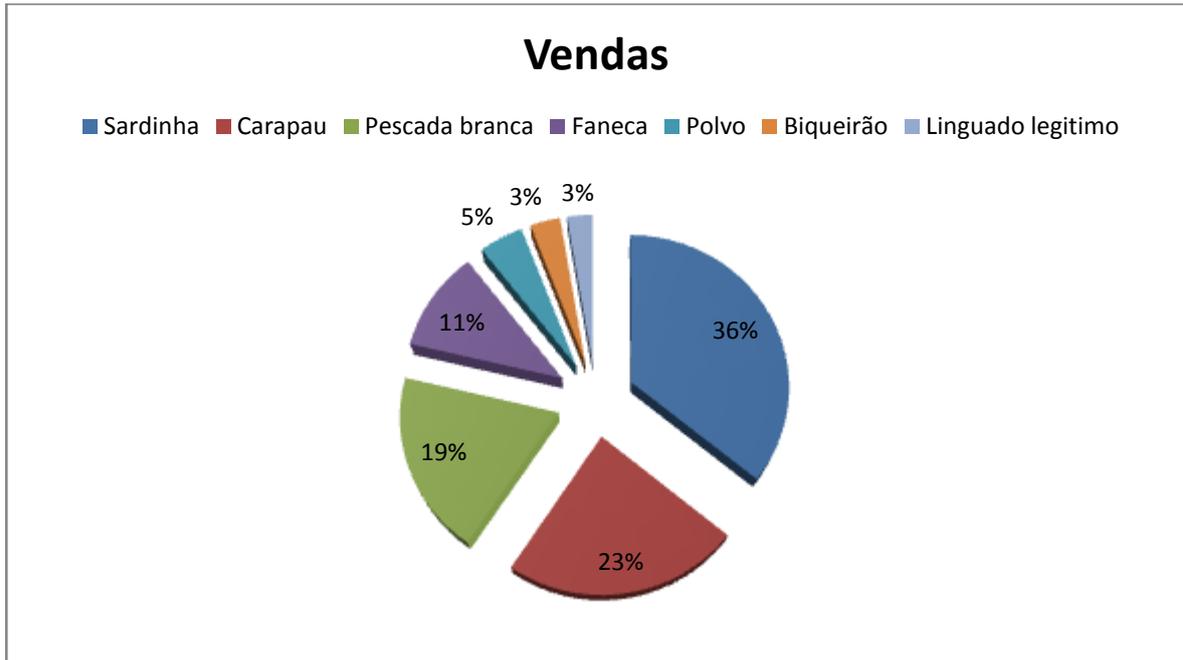


Gráfico 3 - Espécies mais vendidas (mais de 5000 Kg) no mês de janeiro.

Com base nos dados recolhidos, conclui-se que a sardinha é a espécie que tem maior representatividade em lota, encontrando-se a faneca no grupo das espécies mais vendidas em ambos os meses.

No que se refere às rejeições registadas durante estes meses, verifica-se que houve uma maior quantidade de rejeições no mês de janeiro, que se deveu, essencialmente, à quantidade de caranguejo rejeitado por não se encontrar limpo e escolhido (gráfico 4).

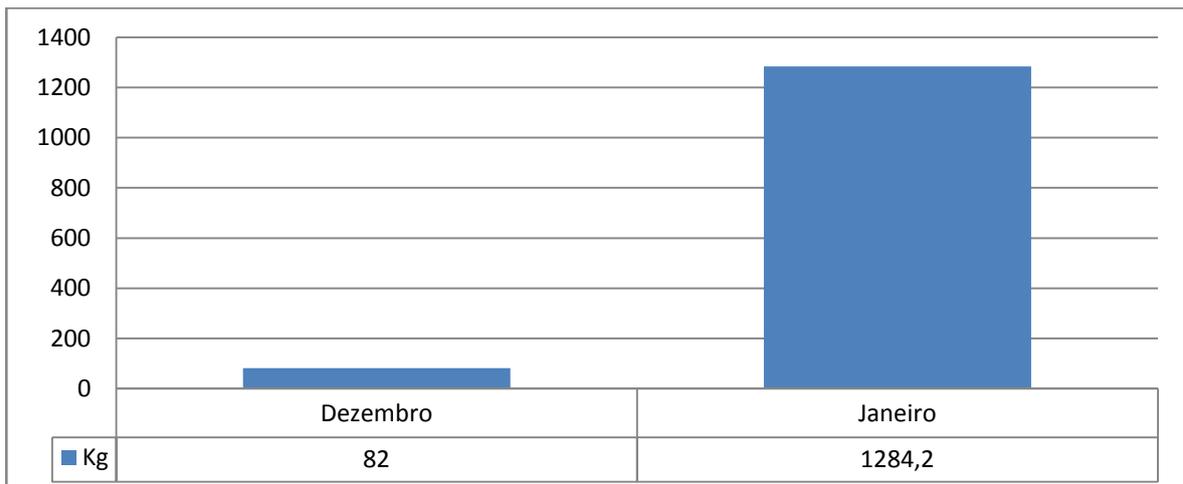


Gráfico 4 - Número total de rejeições na inspeção durante o período de estágio.

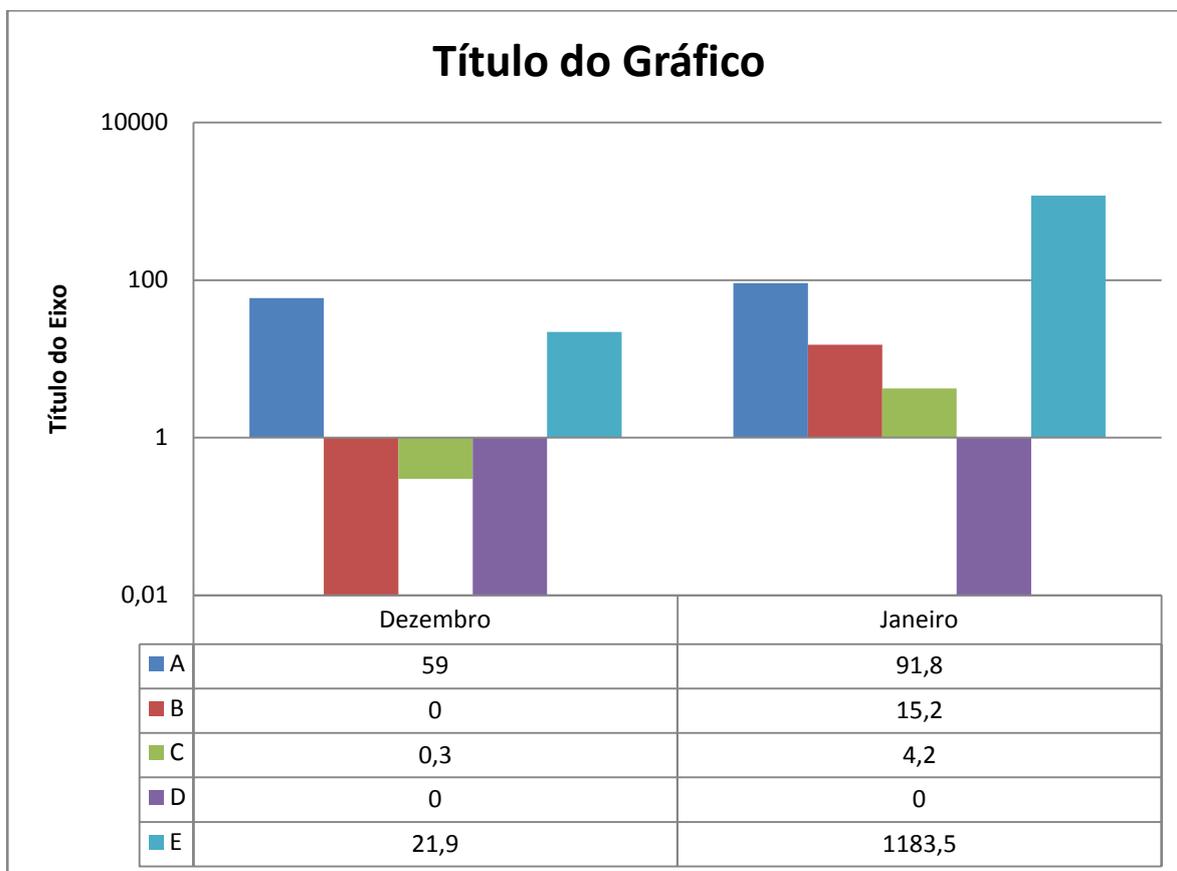
Na tabela 1, estão enumeradas todas as espécies assim como as quantidades, rejeitadas nestes meses, no ato de inspeção sanitária.

Tabela 1 – Quantidade de pescado rejeitado, segundo a espécie, durante o período de estágio.

| | dezembro | janeiro |
|------------|----------|---------|
| Ruivo | 2,6 | 9,2 |
| Santola | 1,1 | 0,5 |
| Pescada | 12,8 | 10,1 |
| Corvina | 3,5 | 0 |
| Linguado | 35,3 | 12,4 |
| Pata-roxa | 10,6 | 34 |
| Dourada | 0,3 | 1,2 |
| Pargo | 0,5 | 0 |
| Sargo | 0,5 | 0 |
| Besugo | 0,3 | 2,4 |
| Solha | 7 | 0 |
| Robalo | 1,5 | 7,9 |
| Cavala | 0,8 | 0 |
| Salmonete | 0,4 | 0,6 |
| Carapau | 0,4 | 1,2 |
| Choupa | 0,4 | 0,8 |
| Faneca | 4 | 2,8 |
| Azevia | 0 | 5,3 |
| Tainha | 0 | 1,5 |
| Peixe-galo | 0 | 3,8 |
| Língua | 0 | 1,4 |
| Judeu | 0 | 1 |
| Sável | 0 | 2 |
| Caranguejo | 0 | 1183,5 |
| Sarrajão | 0 | 2 |
| Galeota | 0 | 0,2 |

Por fim, no gráfico 5, faz-se referência às diferentes causas de rejeição. No mês de dezembro, a principal causa deveu-se ao não cumprimento do ponto A, ao contrário do

mês de janeiro, em que as rejeições foram devidas, principalmente, ao incumprimento do ponto E.



Legenda:

| | |
|----------|---|
| A | Alterados (falsificados, avariados ou corruptos) |
| B | Repugnantes (parasitas, tumores e cheiros anormais) |
| C | Excessiva magreza |
| D | Suspeitos de veicular micro-organismos ou substâncias tóxicas |
| E | Outras |

Gráfico 5 - Principais causas de rejeições durante o período de estágio.