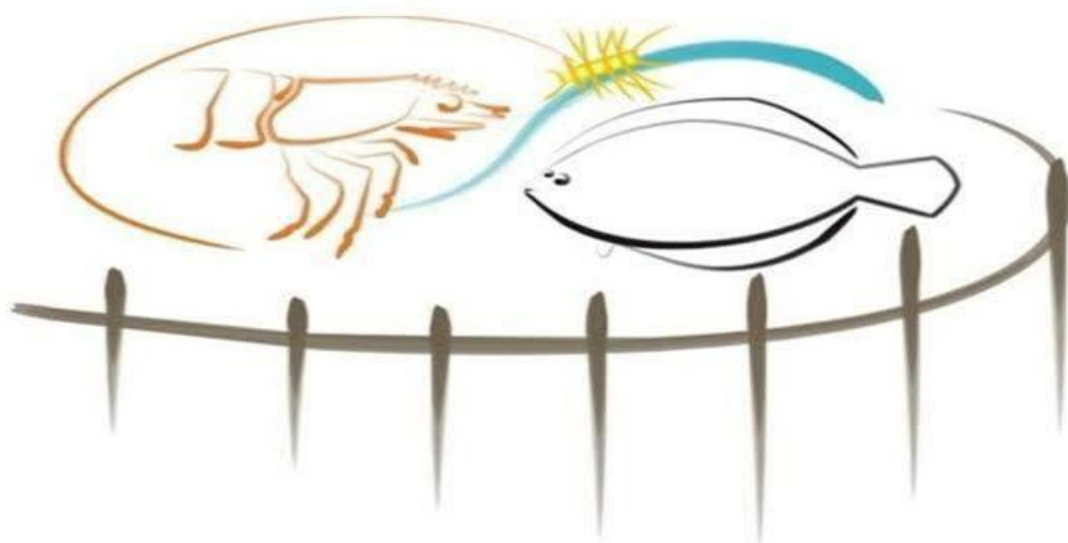




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



Desenvolvimento de vacina contra *Amyloodinium ocellatum* e

Imunização de tainha *Mugil liza*

LUANA BORTOLINI GIESTA

RIO GRANDE, RS

Verão, 2025

Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

**Desenvolvimento de vacina contra *Amyloodinium ocellatum* e
Imunização de tainha *Mugil liza***

Luana Bortolini Giesta

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestra em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Dr. Luís Alberto Romano

Coorientadora: Dra. Virgínia Fonseca Pedrosa

RIO GRANDE, RS

Fevereiro, 2025

Ficha Catalográfica

G455d Giesta, Luana Bortolini.

Desenvolvimento de vacina contra *Amyloodinium ocellatum* e
imunização de tainha *Mugil liza* / Luana Bortolini Giesta. – 2025.
44 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio
Grande/RS, 2025.

Orientador: Dr. Luís Alberto Romano.

Coorientadora: Dra. Virgínia Fonseca Pedrosa.

1. Vacinação intraperitoneal 2. Tomontes 3. Parasita
4. Teleósteos I. Romano, Luís Alberto II. Pedrosa, Virgínia Fonseca
III. Título.

CDU 639.2.09

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

ATA 06/2025

ATA DE DEFESA DA 250ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AQUICULTURA

No dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, às quatorze horas, reuniu-se a Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado em Aquicultura, de **LUANA BORTOLINI GIESTA**, orientada pelo Prof. Dr. Luis Alberto Romano, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Luis Alberto Romano (Orientador – IO/FURG), Profa. Dra. Virginia Fonseca Pedrosa (Coorientadora/UFAL), Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues (IO/FURG) e Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva (Instituto de Pesca/SP). Título da Dissertação: “**Desenvolvimento de vacina contra *Amyloodinium ocellatum* e imunização de tainha *Mugil liza***”. Dando início à defesa, o Coordenador do PPGAq Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, passou a presidência da sessão ao Prof. Dr. Luis Alberto Romano, que na qualidade de orientador, passou a palavra para a candidata apresentar a Dissertação. Após ampla discussão entre os membros da Banca e a candidata, a Banca se reuniu sob a presidência do Coordenador. Durante esse encontro ficou estabelecido que as sugestões dos membros da Banca Examinadora devem ser incorporadas na versão final da Dissertação, ficando a cargo do Orientador o cumprimento desta decisão. A candidata **LUANA BORTOLINI GIESTA** foi considerada **APROVADA**, devendo a versão definitiva da Dissertação ser entregue a Secretaria do PPGAq, no prazo estabelecido nas Normas Complementares do Programa. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, será assinada pela Banca Examinadora, pela candidata e pelo Coordenador do PPGAq.

Documento assinado digitalmente



LUIS ALBERTO ROMANO
Data: 13/03/2025 15:47:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

PROF. DR. LUIS ALBERTO ROMANO (ORIENTADOR – IO/FURG)

Documento assinado digitalmente



VIRGINIA FONSECA PEDROSA
Data: 07/03/2025 16:47:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

PROFa. DRa. VIRGINIA FONSECA PEDROSA (CO-ORIENTADORA – UFAL)

Documento assinado digitalmente

PROFa. DRa. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA (IP/SP)



MARIA JOSE TAVARES RANZANI DE PAIVA
Data: 13/03/2025 14:45:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

LUANA BORTOLINI GIESTA



Documento assinado digitalmente
LUANA BORTOLINI GIESTA
Data: 07/03/2025 14:14:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente



RICARDO VIEIRA RODRIGUES
Data: 07/03/2025 14:42:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

PROF. DR. RICARDO VIEIRA RODRIGUES (Coordenador do PPGAq)

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	6
1 Introdução	7
1.1 Aquicultura	7
1.2 Tainha	8
1.3 Enfermidades.....	9
1.4 <i>Amyloodinium ocellatum</i>	9
1.4.1 Diagnóstico.....	11
1.4.2 Tratamentos e Profilaxia.....	11
1.5 Vacinas.....	12
2 Objetivos	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 Material e Métodos	15
3.1 Aspectos Éticos	15
3.2 Coleta e Aclimação dos Peixes	15
3.3 Desenho Experimental	16
3.4 Protocolo de Preparo de Antígenos.....	16
3.5 Protocolo de Vacinação	18
3.6 Desafio com tomontes de <i>A. ocellatum</i>.....	19
3.7 Parâmetros Zootécnicos.....	19
3.8 Coleta e Análise de Amostras	19
3.9 Análise Estatística.....	20
4 Resultados.....	20
4.1 Qualidade de Água.....	20
4.2 Parâmetros Zootécnicos	21
4.3 Lesões Histopatológicas encontradas nas Brânquias	22
5 Discussão.....	25
REFERÊNCIAS.....	29

Dedico esse trabalho a todas as mulheres que vieram antes de mim, cujo afetos, histórias e lutas pavimentaram o caminho. Às mulheres que compartilham o tempo-espço comigo, com quem aprendo, troco e cresço. E a todas as que virão, que encontrem amor, alegrias, força e coragem nos passos de quem as precedeu. Que nossa resistência seja sempre a luz que ilumina o caminho das futuras gerações!

Agradecimentos

Gracias a la vida, que me ha dado tanto.

Agradeço a todas e todos que tornaram possível a realização do meu mestrado.

Agradeço a minha mãe e meu pai, os melhores do mundo, sem os quais eu jamais teria forças ou condições pra fazer o mestrado. Agradeço pela rede de apoio, pelo suporte emocional, incondicional, motivacional, alimentar (risos) e financeiro AINDA (risos). Amo vocês, sempre. Esse título de Mestre será meu e nosso!

Agradeço ao Cícero, filhotinho da mamãe, que sempre está comigo, nas muitas alegrias e algumas brabezas; que vem comigo pra EMA e está junto, seja no laboratório, nas tainhas, nas macroalgas, no camarão. Meu parceirinho de aventuras dentro e fora da minha trajetória acadêmica.

Agradeço ao meu orientador, professor Romano, por ser mais que um orientador, um mestre. Por seus ensinamentos diários, sobre imunologia, histopatologia, filosofia, medicina, história, política, humanidade. São bons demais nossos cafés (re)diários “con mucha leche” e “una bolachinha más”, tua companhia nos dias mais difíceis e também nos mais fáceis.

Gostaria também de agradecer aos membros da banca examinadora, Ricardo e Masé, por aceitarem o convite para participarem da minha defesa de mestrado. Fico muito honrada e tenho certeza que suas contribuições serão de grande valia.

Agradeço às minhas amigas da EMA pela parceria, pelas risadas, pelas danças, pelos muitos momentos em que fomos (e somos) felizes juntas: Maria, Cybele e Nathielly.

Agradeço à Flor, minha amiga & instrutora de Yoga, que com mucho afeto me ensinou a respirar. Para não pirar. Te quero mucho! E sou muito grata.

Agradeço à Olívia, que esteve presente em tantos momentos fundamentais da minha pesquisa e também da minha vida pessoal. Agradeço por toda a ajuda! Obrigada por ser uma mulher, mãe, que apoia outras mulheres, mães. Sigamos juntas!

Agradeço ao meu colega de laboratório, Pedro, pela companhia nos cafés, almoços, chocolates e drinks; pela sorte diária, pelos nossos papos e desabafos. Agradeço a Virgínia, pelo afeto, pelo incentivo, pela companhia nos barzinhos. Gracias pelos ensinamentos!

Agradeço a todos os que me ajudaram nas MUITAS tentativas de coletas de peixes! Leo, Wik, Cybele, Erasmo, Navi, Baloi, Maria, Jean, Ricardo, Ivanilson, Motora...

Gracias mil! Agradeço à galera da EMA pelas conversas, risadas, cafés (muitos), cervejas (muitas mesmo), churrascos e companheirismo. Henrique, Erasmo, Wik, Edras, Lari, Fernanda, Lethicia, Kim, Leo, Lucas, Helder e todo o pessoal dos rolês. Agradeço aos amigos do outro lado do oceano, pela amizade e gastronomias. Meu parceiro representante, José Artur, pela cumplicidade e amizade nessa desafiadora tarefa. Agradeço aos meus estagiários queridos, Eduarda e Luiz. Eu amei trabalhar com vocês, e agradeço a dedicação e o auxílio no meu trabalho. Nos encontraremos novamente!

Agradeço aos professores excelentes que tive, onde pude aprender praticamente tudo que sei sobre o universo da Aquicultura. Sou grata pelas aulas, papos de corredor, conselhos diversos e parcerias de trabalho. Agradeço ao pessoal da secretaria (em especial Ane) por me aguentar praticamente dia sim/dia não, ao pessoal terceirizado que trabalha na ema: Veri, Seu Carlos, Alex, vigilantes.

Agradeço aos meus amigos de fora da EMA, principalmente à Franci minha amiga de todos os tempos, pelo afeto, pela amizade, pelo amor incondicional, por ter me amparado (junto com minha mamis) no momento mais difícil que já passei. Agradeço à Milena, minha amiga de anos, das conversas diárias, dos áudios infinitos, pelo suporte, pela amizade. Agradeço à Ju, minha amiga recente, mãe, intensa, afetiva, infinita. Juntas somos imbatíveis!

Agradeço ao meu amigo Gabs, pelos rolês e matezitos, brindes, carinho, afeto, papos sérios e risadas mil. Fausto e Jean pelo amor de sempre, pelo apoio emocional, minhas saudades diárias. Agradeço à minha tia Zita, por ter me apoiado desde o início, de perto e de longe, por ter acreditado em mim. Agradeço ao Breno, pai do Cícero, pela contribuição nessa minha jornada. Agradeço a todos os que se fizeram importantes pra que eu me lançasse nessa caminhada (aqui não cito nomes, cada um sabe).

Agradeço às minhas avós: Lourdes e Ceci, por serem inspirações diárias, exemplos de mulheres lindas, fortes e corajosas. Vó Lourdes por seguir me amando mesmo de longe, mesmo eu estando longe do fogão à lenha e da tua companhia diária. Vó Ceci, por me acolher tão bem, junto com meu filhote, nesse lugar tão bom que chamamos de lar. Se não fosse por ti, por minha mãe e por meu pai, provavelmente eu não estivesse escrevendo esse agradecimento no dia de hoje. Amo vocês.

Agradeço a mim mesma, por não ter desistido. Por ter persistido, insistido, resistido. Por ter teimado. O que não nos derruba, nos fortalece. Realmente.

Agradeço às divindades que acredito e tenho fé. Que iluminaram meu caminho e me guiaram até aqui. Agradeço à mãe Iemanjá!

Por fim, agradeço a quem não agradei, mas se fez importante em alguma parte dessa jornada. Ficam aqui, nesses parágrafos, alguns agradecimentos. Uma pequena parcela do mar de gratidão que sinto aos escrever essas palavras.

Resumo

A tainha *Mugil liza* é a principal espécie da família Mugilidae para a pesca comercial ao longo da costa brasileira. Atualmente sua população está em declínio devido à sobre-exploração dos estoques naturais. A aquicultura surge como uma alternativa para reduzir a pressão sobre essas populações selvagens. Nesse contexto, diversos estudos têm sido realizados para viabilizar a produção de *M. liza* em cativeiro. Entre as principais doenças que afetam a produção em sistemas de produção de peixes marinhos, destaca-se a amiloodiniose, provocada pelo dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum*, parasita responsável por infecções que elevam as taxas de mortalidade nos peixes. O ciclo de vida trifásico do parasita dificulta seu controle efetivo e a prevenção da enfermidade. A imunização dos peixes contra o parasita se mostra um caminho para a prevenção da amiloodiniose. O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma vacina contra *A. ocellatum* para a tainha *M. liza*. A vacina foi administrada via intraperitoneal e os peixes foram posteriormente expostos a um desafio com tomontes de *A. ocellatum*. Os resultados mostraram uma taxa de sobrevivência significativamente maior nos peixes vacinados, com 97,73% de sobrevivência no tratamento vacinal, em comparação a apenas 20% no grupo controle. A histopatologia mostrou que as brânquias dos peixes vacinados apresentaram morfologia normal, enquanto os peixes do grupo controle exibiram alterações histopatológicas de hiperplasia moderada a severa nas lamelas proximais e distais, ruptura de células pilares e necrose. Esses resultados indicam que a vacinação com tomontes de *Amyloodinium ocellatum* tratados por sonicação e congelamento, foi eficaz em induzir uma alta taxa de sobrevivência nos peixes, sugerindo seu potencial para uso na imunização de *M. liza* contra a amiloodiniose.

Palavras-chave: Vacinação intraperitoneal, tomontes, parasita, teleósteos.

Abstract

The mullet *Mugil liza* is the main species of the Mugilidae family for commercial fishing along the Brazilian coast. Its population is currently in decline due to overexploitation of natural stocks. Aquaculture has emerged as an alternative to reduce the pressure on these wild populations. In this context, various studies have been carried out to make the production of *M. liza* viable in captivity. Among the main diseases affecting production in marine fish production systems is amyloodiniosis, caused by the dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*, a parasite responsible for infections that increase fish mortality rates. The parasite's three-phase life cycle makes it difficult to effectively control and prevent the disease. Immunizing fish against the parasite is a way of preventing amyloodiniosis. The aim of this study was to develop a vaccine against *A. ocellatum* for the mullet *M. liza*. The vaccine was administered intraperitoneally and the fish were subsequently challenged with *A. ocellatum* tomonts. The results showed a significantly higher survival rate in the vaccinated fish, with 97.73% survival in the vaccine treatment, compared to only 20% in the control group. Histopathology showed that the gills of the vaccinated fish had normal morphology, while the fish in the control group exhibited histopathological changes of moderate to severe hyperplasia in the proximal and distal lamellae, rupture of pillar cells and necrosis. These results indicate that vaccination with *Amyloodinium ocellatum* tomonts treated by sonication and freezing was effective in inducing a high survival rate in the fish, suggesting its potential for use in the immunization of *M. liza* against amyloodiniosis.

Keywords: Intraperitoneal vaccination, tomonts, parasite, teleosts.

1 Introdução

1.1 Aquicultura

Com o crescimento populacional, houve aumento na demanda de proteína de alta qualidade para a alimentação mundial. A pesca, entretanto, não consegue manter uma produção de pescado suficiente para atender as necessidades da população (Jiang, 2010).

A exploração dos recursos pesqueiros chegou ao ponto de colapso, onde a população natural não consegue recuperar seus estoques. Assim, temos uma estagnação na produção de pescado oriundo da captura (FAO, 2024).

A necessidade de atender ao mercado fez com que fossem aprimoradas as técnicas empregadas no cultivo de organismos aquáticos em cativeiro (Jiang, 2010). Logo, a aquicultura possui um importante papel na garantia da segurança alimentar mundial, por contribuir diretamente na produção de alimentos (FAO, 2024).

A produção total de pescado atingiu o marco de 223,2 milhões de toneladas em 2022. A aquicultura, responsável por mais da metade dessa produção, pela primeira vez superou a produção proveniente da captura pesqueira (FAO, 2024). Esse aumento na produção da aquicultura é fruto, principalmente, de evoluções tecnológicas que tiveram um grande avanço nas últimas décadas (Yue *et al.*, 2016).

No Brasil, a região sul a maior produtora de pescado, responsável por um terço da produção nacional. Essa produção é liderada por peixes exóticos, como a tilápia do Nilo. A produção de peixes nativos no Estado do Rio Grande do Sul foi de 1300 *ton* em 2023, se concentrando principalmente em peixes redondos (Peixe Br, 2024). O Brasil possui uma imensa e promissora costa, com grande potencial para aquicultura marinha de peixes nativos.

Para impulsionar o cultivo de espécies nativas com potencial para aquicultura é necessário o desenvolvimento de pacotes tecnológicos. Estes são essenciais para fortalecer e viabilizar os cultivos. Nesse sentido, o peixe-rei marinho, o linguado e a tainha são algumas das espécies interessantes ao cultivo e populares no Rio Grande do Sul (Baldiasserotto e Gomes, 2010).

Muitos estudos para o cultivo de espécies nativas foram desenvolvidos no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM) da Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Esses trabalhos tiveram início com os estudos de Phonlor & Vinagre (1989) sobre larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis*; seguidos de estudos como a reprodução em cativeiro de *Paralichthys orbignyanus* (Sampaio *et al.*, 2008); o cultivo de *Micropogonias furnieri* (Sampaio *et al.*, 2011); efeitos de parâmetros ambientais como temperatura (Okamoto *et al.*, 2006), salinidade (Lisboa *et al.*, 2015) e nutrição (Ramos *et al.*, 2015) de tainha (*Mugil liza*).

Considerada um recurso pesqueiro fundamental no sul do Brasil (Mafra *et al.*, 2020) e com suas características de rusticidade, a tainha se mostra uma espécie de interesse para a aquicultura marinha.

1.2 Tainha

As tainhas são peixes da ordem dos Mugiliformes e família mugilidae encontradas em zonas costeiras tropicais, subtropicais e temperadas (Menezes e Figueiredo, 1985). No Brasil, são conhecidas seis espécies: *M. rubrioculus*, *M. incilis*, *M. curvidens*, *M. curema*, *M. liza*, e *M. brevirostris* (Menezes *et al.*, 2015; Mai *et al.*, 2018).

A *M. liza* ocorre desde o mar do Caribe até a Argentina (Menezes *et al.*, 2015; Mai *et al.*, 2019) e é considerada uma espécie estuarina dependente. No Estuário da Lagoa dos Patos, a tainha se desenvolve e migra para o mar para o amadurecimento das gônadas e desova (da Costa *et al.*, 2021).

Na costa brasileira a tainha se destaca dentro da atividade pesqueira do país (Lemos *et al.*, 2014; Mai *et al.*, 2018). Sua pesca é uma atividade sazonal tradicional entre os pescadores artesanais das regiões Sul e Sudeste, reconhecida como Patrimônio Histórico, Artístico e Cultural do Estado de Santa Catarina (Brasil, 2015).

O maior volume de produção de pescado, entretanto, é proveniente da extração industrial. Recentes estudos sugerem uma tendência ao declínio populacional da espécie *M. liza*, principalmente por se tratar de um peixe sobre-explorado (Brasil, 2015; da Costa *et al.*, 2021).

Assim, a tainha se apresenta como uma espécie de interesse para o cultivo em cativeiro, no intuito de contribuir para o suprimento da demanda de pescado sem impactar

negativamente as reservas naturais (Jiang, 2010). O cultivo em cativeiro pode predispor a enfermidades, principalmente em animais provenientes do ambiente natural. Sabe-se que os animais são submetidos a fatores de estresse nos cultivos, e que a resposta imune pode ser comprometida por eventos de estresse (Anderson e Romano, 1998; Noga *et al.*, 2010; Noga *et al.*, 2012).

1.3 Enfermidades

A intensificação da aquicultura nos últimos anos aumentou a ocorrência de doenças em ambientes de cultivo. Diferentes são os patógenos responsáveis pelas perdas econômicas ao setor da aquicultura (Peeler e Nicholas, 2011; Rico *et al.*, 2012; Assefa e Abunna, 2018; Wang *et al.*, 2021; Rai *et al.* 2023).

Dentre as enfermidades, temos as infecciosas e não infecciosas (Ferguson, 1989). As doenças parasitárias afetam significativamente a aquicultura em todo o mundo. Em diversas regiões, essas doenças representam um obstáculo importante para a viabilidade econômica da produção (Assefa e Abunna, 2018; Shinn *et al.*, 2015; Rai *et al.*, 2023). Considerando o impacto dos parasitas na aquicultura marinha, o *Amyloodinium ocellatum* é o protozoário parasita mais patogênico (Woo, 2007; Byadgi *et al.*, 2021).

1.4 *Amyloodinium ocellatum*

O *A. ocellatum* (Blastodiniphyceae) é um dinoflagelado não-específico, que afeta diferentes hospedeiros em regiões tropicais e subtropicais, (Noga e Levy, 2006). A parasitose pode acometer as brânquias e a pele, sendo conhecida como “veludo marinho” (Levy *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2024). Causa infecções que podem levar a mortalidades de 50 a 80%, e a 100% em infecções severas (Francis-Floyd, 2011; Moreira *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2019; Massimo *et al.*, 2022).

O parasita é um protozoário com ciclo de vida direto e trifásico, o que dificulta o seu controle (Paperna, 1984). Consiste em três fases:

1. Estágio de trofonte (parasitário): alimenta-se diretamente do hospedeiro. Normalmente encontrado nas brânquias e epitélio da pele. Já foram encontrados trofontes aderidos ao epitélio da cavidade orofaríngea (Beraldo *et al.*, 2017). Ao atingirem a maturação,

desprendem-se do hospedeiro e se transformam no estágio encistado, ou tomonte (Brown, 1931; Nigrelli, 1936; Brown e Hovasse, 1946).

2. Estágio de tomonte (reprodutivo): encistado, consegue ser muito resistente a agentes químicos, variações de temperatura e de salinidade. Após subseqüentes divisões mitóticas pode produzir até 256 novos espécimes (dinosporos) (Brown, 1931; Li *et al.*, 2024).

3. Estágio de dinosporo (infectante): é o estágio móvel que eclode do tomonte de *A. ocellatum*. Na fase infecciosa são facilmente observados na água e fômites. Além disso, dinosporos também podem ser transmitidos por aerossóis (Roberts-Thomson *et al.*, 2006). A partir da Figura 1 pode-se visualizar o ciclo de vida, com todas as fases descritas.

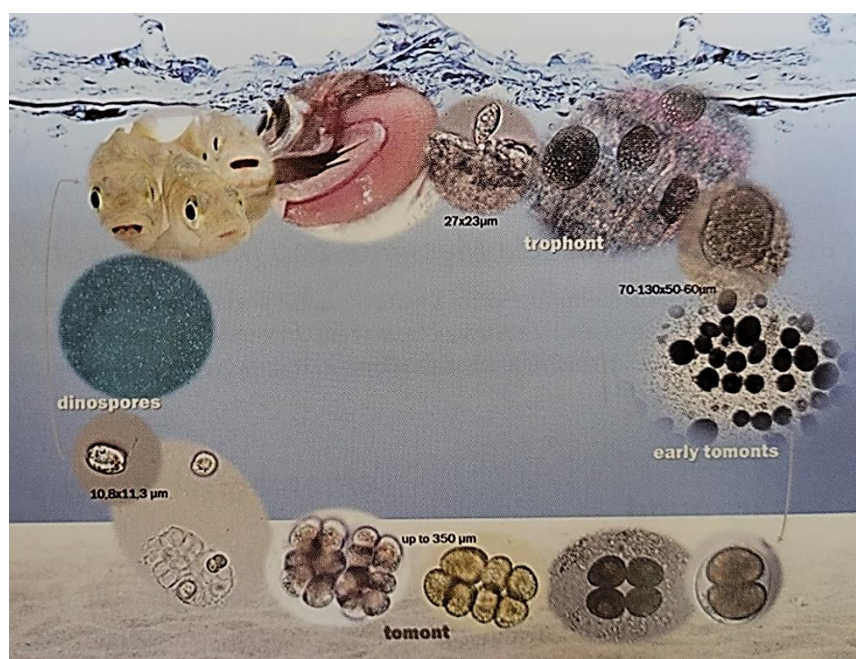


Figura 1. Representação do ciclo de vida do *A. ocellatum*. Fonte: Paola Beraldo in: Sitjà-Bobadilla e Piazzon, 2021.

Se a concentração de dinosporos no meio aquático for muito alta, a morte do hospedeiro pode ocorrer em <12 horas. Em geral, o ciclo de vida pode ser completado em 5-7 dias, dependendo das condições de salinidade e temperatura (Lawler, 1980).

Embora sua temperatura ideal seja 23-27°C e salinidade de 30-35g/L, esse dinoflagelado também pode ser virulento em condições extremas. Já foram registrados surtos da doença em altas temperaturas (>35°C), em água do mar (46g/L) e ambientes salobros (7g/L) (Woo, 2006; Beraldo *et al.*, 2017).

Além disso, o parasita é caracterizado por baixa especificidade de espécie hospedeira. Nos meses mais quentes possui maior morbidade e é capaz de gerar maior mortalidade nos cultivos. Devido à rápida proliferação de *A. ocellatum*, percebemos a importância da profilaxia e diagnóstico precoce (Soares *et al.*, 2012).

1.4.1 Diagnóstico

O diagnóstico da enfermidade consiste na observação de sinais clínicos, visualização direta dos parasitas nas brânquias e/ou pele e na observação de lesões compatíveis com a enfermidade através das lesões histopatológicas. O diagnóstico pode ser feito com a coleta da pele ou brânquias de animais, seguido da observação direta no microscópio (Sitjà-Bobadilla e Piazzon, 2021).

As lesões histopatológicas são caracterizadas por hiperplasia branquial severa, inflamação, hemorragia e necrose focal e difusa, relacionadas com a anoxia, que frequentemente ocasiona a morte dos peixes (Moreira *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2019; Massimo *et al.*, 2022; Giesta *et al.*, 2023). Infestações leves também apresentam alta mortalidade, devido à disfunção osmorregulatória e a infecções microbianas secundárias (Noga *et al.*, 2010; Noga *et al.*, 2012).

A amilodiniose consiste em uma doença “silenciosa”, que só possui sinais clínicos evidentes nas parasitoses severas. Os sinais clínicos são caracterizados por mudanças no comportamento dos peixes, natação errática, diminuição do consumo de ração, boquejamento. Entretanto, os sinais clínicos podem ser ausentes em infecções leves (Soares *et al.*, 2012; Sitjà-Bobadilla e Piazzon, 2021).

No momento em que os sinais clínicos da doença se tornam evidentes, uma vez que o quadro já está em estágio avançado, se torna difícil o controle do parasita (Soares *et al.*, 2012). Assim, é necessário que os surtos de amilodiniose sejam tratados assim que identificados (Ramos e Oliveira, 2001).

1.4.2 Tratamentos e Profilaxia

As medidas profiláticas devem ser aliadas na manutenção da sanidade dos cultivos. Métodos preventivos como ultravioleta (UV), ozônio e cloro para tratamento da água são capazes de reduzir os riscos de contaminação com o parasita e outros agentes (Lawler *et al.*, 1977; Noga *et al.*, 2010). Protocolos de higiene, como a remoção de peixes

mortos dos tanques de cultivo, vazio sanitário e quarentena devem ser seguidos sistematicamente (Soares *et al.*, 2012).

Quando a infecção já existe, são aconselhados banhos de água doce para estimular a soltura dos parasitas das brânquias e pele dos animais, em espécies tolerantes (Noga *et al.*, 2010). Em conjunto a essa medida, costumam se associar abordagens terapêuticas.

São utilizados diversos tratamentos na tentativa de reduzir as taxas de mortalidade e a disseminação do parasita. Dentre os tratamentos mais utilizados para o controle de *A. ocellatum* no Brasil, existe o sulfato de cobre que atua nos dinosporos, e interrompe o ciclo de vida do parasita. Também são usados tratamentos com formaldeído, peróxido de hidrogênio, ácido acético, entre outras substâncias (Lawler *et al.*, 1977).

Os tratamentos in vivo em pargos infestados por *A. ocellatum* com imersão em água doce por 1 hora, com peróxido de hidrogênio foram descritos como promissores (Cruz-Lacierda *et al.*, 2004). Adicionalmente, abordagens terapêuticas utilizando formaldeído demonstraram ser eficazes, conforme evidenciado por Hu *et al.* (2019).

De modo geral, se recomendam várias repetições do tratamento escolhido, no intuito de eliminar o parasita a partir da ação do fármaco no estágio parasitário mais suscetível (Sitjà-Bobadilla e Piazzon, 2021).

Os tomontes tem maior resistência ao cobre e agentes químicos em geral e suportam concentrações até dez vezes superiores às utilizadas usualmente (Paperna *et al.*, 1984). Essa característica dificulta o controle efetivo do parasita, o que torna muito difícil a eliminação completa nos cultivos. Nesse sentido, a pesquisa por métodos de imunização se torna um passo importante.

1.5 Vacinas

A dificuldade no tratamento das doenças parasitárias, desperta o interesse em métodos de imunização. A pesquisa de técnicas em imunização é amplamente realizada em diversas espécies de teleósteos (Ma *et al.*, 2019; Muñoz-Atienza *et al.*, 2021; Mondal e Thomas, 2022).

O objetivo de uma vacina consiste em proporcionar proteção total ou parcial, de médio e/ou longo prazo, contra um antígeno específico. Esse processo ocorre por meio da indução de uma resposta imune de memória, que envolve células B e/ou T (Dixon e Stet, 2001), sendo o linfócito T4(CD4) o responsável por articular a maior parte das respostas a diferentes antígenos.

As células apresentadoras de antígeno (APCs), principalmente melanomacrófago, mastócito e células granulares eosinofílicas, desempenham um papel fundamental na degradação dos antígenos, e apresentação para células T auxiliares CD4+ e T citotóxicas CD8+ (Zhao *et al.*, 2016). As células B podem exercer a função de células apresentadoras de antígeno (APCs) ao processar e apresentar antígenos às células T. Este mecanismo resulta na ativação das células B e conduz à efetivação da resposta imunológica subsequente (Dixon e Stet, 2001).

Após a ativação, as células B iniciam um processo de diferenciação que resulta na formação de plasmócitos, responsáveis pela secreção de imunoglobulinas (Igs) específicas, denominadas anticorpos, e induzem a formação de memória imunológica (da Costa Klosterhoff *et al.*, 2020; Palm e Henry, 2019).

Nos peixes, o timo desempenha importante papel no sistema imune e suas respostas (Boehm, 2012). As respostas imunológicas podem ser timo-dependentes (TD), nas quais a ativação das células B é mediada pelas células T auxiliares, e timo-independentes (TI), onde as células B são diretamente ativadas pelo antígeno (Dixon e Stet, 2001; Zens *et al.*, 2016; Takamura, 2018; da Costa Klosterhoff *et al.*, 2020).

Não existem muitos estudos com relação ao sistema imunológico da tainha. O timo, órgão central do sistema imune e sua origem embriogênica foram descritos (de Medeiros *et al.*, 2020), porém, não há estudos que descrevam as células envolvidas na comunicação entre a resposta imune inata e a específica. Na truta, essas células foram descritas com profundidade e foi evidenciado uma diferença entre as populações celulares de mastócitos e células granulares eosinofílicas (Romano *et al.*, 2021).

Assim, a vacina possui potencial de gerar uma resposta imunológica adequada desde que os peixes sejam imunocompetentes e com os órgãos do sistema imune maturados. Conforme descrito por de Medeiros *et al.*, (2020), o timo da tainha já produz

linfócitos T4 após os 10 dias de vida. Desta maneira, torna-se possível a vacinação de formas juvenis dessa espécie, visando minimizar perdas em sistemas de cultivo.

Os peixes podem ser imunizados através de injeção intraperitoneal ou intramuscular, imersão e via oral. As vacinas intraperitoneais são mais estudadas, e se mostram eficientes na estimulação da produção de anticorpos (Meng-Han, 2024). Isso assegura uma maior duração na proteção do peixe contra o patógeno.

Entretanto, ainda não existem vacinas comerciais disponíveis para o tratamento de protozoários parasitas de peixes, incluindo os dinoflagelados (Woo, 2007; Cobb *et al.*, 1998). A ocorrência do parasita nos diferentes cultivos de espécies marinhas, não apenas no Brasil (Mai *et al.*, 2018) torna a busca por uma vacina eficiente na prevenção de infestações do *A. ocellatum* relevante para a pesquisa. O tomonete de *A. ocellatum* se mostra um estágio adequado para a formulação da vacina, já que possui todo o material genético de um parasita adulto (Cecchini *et al.*, 2001).

A tainha se apresenta como um bom modelo experimental, visto que consiste em uma espécie com potencial de cultivo para a aquicultura nacional, e já é cultivada e comercializada com êxito em diversos locais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Elaborar uma vacina contra o dinoflagelado *A. ocellatum* e realizar a vacinação em tainhas (*M. liza*).

2.2 Objetivos Específicos

Coletar os parasitas das brânquias dos peixes e efetuar contagem das células de *A. ocellatum* em câmara de contagem de Sedgewick-Rafter;

Produzir uma vacina a partir de tomonetes sonicados;

Imunizar exemplares de tainha por injeção intraperitoneal;

Submeter os peixes a um desafio com tomonetes de *A. ocellatum*;

Avaliar a taxa de sobrevivência e as possíveis lesões histopatológicas das brânquias da tainha após a aplicação o desafio com tomontes de *A. ocellatum*.

3 Material e Métodos

3.1 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi encaminhado à Comissão de Ética em uso animal da Universidade Federal do Rio Grande (CEUA/FURG), criada através da Resolução nº 033/2008 do Conselho Universitário, sob o registro 23116.007329/2024-85.

Os animais foram coletados em ambiente natural com autorização e regulamentação do órgão competente, SISBIO, sob o registro 92696.

3.2 Coleta e Aclimação dos Peixes

Foram coletados juvenis de tainha na praia do Cassino e transportados até a Estação Marinha de Aquicultura do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (IO - FURG). No Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos (LIPOA), foram aclimatados por um período de 15 dias.

No período de aclimação foi realizado um tratamento com sulfato de cobre preventivo (0,15 a 0,20 mg/L) (Cobb *et al.*, 1998), para evitar presença de parasitas nos animais expostos ao ensaio de imunização. Observada a ausência de parasitas na pele e brânquias, foram dispostos em um tanque de plástico de 250 litros (com 250 L de volume útil), sendo realizada renovação diária de água (70%). Os animais foram alimentados com ração comercial contendo 38% de PB, fornecida duas vezes ao dia *ad libitum*.

Durante a aclimação foi realizado o controle diário dos parâmetros de qualidade de água (Eaton, 2005), mantidos dentro dos valores de referência adequados à espécie. Foram monitorados e controlados: temperatura de $23,01^{\circ}\text{C} \pm 1,21$; oxigênio dissolvido de $7,6 \pm 0,72$ com oxímetro 550A, YSI, EUA; pH de $8,03 \pm 0,09$ com pHmetro EcoSense pH 100A, YSI, EUA; nitrogênio amoniacal total de $1,53 \pm 1,25$ de pelo método azul de endofenol (UNESCO, 1983); e nitrito de $0,01 \pm 0,01$ pela reação de Griess (Aminot e Chaussepied, 1983). A salinidade foi medida com refratômetro ATAGO S/Milli-E, Japão e aumentada diariamente em 5 pontos por dia, até atingir a salinidade

30. A alcalinidade foi medida por titulometria (Baird *et al.*, 2017) e corrigida para 150 com a utilização de bicarbonato de sódio sempre que necessário.

3.3 Desenho Experimental

O experimento consistiu em 2 etapas: Etapa de Imunização e Etapa de Desafio com tomites de *A. ocellatum*. Sendo que inicialmente os peixes foram imunizados e, decorridos 15 dias, submetidos ao desafio com tomites de *A. ocellatum*.

Foi realizado o Tratamento Vacina (TV) em triplicata, com 15 animais/tanque; e o Tratamento Controle (TC) em triplicata, com 15 animais/tanque. O total utilizado no experimento foi de 90 animais.

Os exemplares foram dispostos em tanques de 100 litros (com 100 L de volume útil), sendo realizada renovação diária de água de 20%. Cada tanque foi acrescido de um pequeno filtro biológico contendo *bioball* maturada e aeração constante. Os animais foram alimentados com ração comercial contendo 38% de PB, fornecida duas vezes ao dia, sendo 8% da biomassa.

Os peixes foram observados durante 41 dias e diariamente foi avaliada a mortalidade dos animais. Ao final do experimento, foram coletados 3 animais/tanque, eutanasiados e fixados em formol tamponado neutro a 20% para estudo histopatológico.

Foi realizado o controle diário dos parâmetros de qualidade de água (Eaton, 2005): temperatura, oxigênio dissolvido (oxímetro 550A, YSI, EUA), salinidade (refratômetro ATAGO S/Milli-E, Japão), pH (pHmetro EcoSense pH 100A, YSI, EUA), alcalinidade por titulometria (Baird *et al.*, 2017), nitrogênio amoniacal total pelo método azul de endofenol (UNESCO, 1983) e nitrito pela reação de Griess (Aminot e Chaussepied, 1983).

3.4 Protocolo de Preparo de Antígenos

Os parasitas utilizados na preparação dos antígenos foram adquiridos a partir de um surto espontâneo da enfermidade, ocorrido entre janeiro e março de 2024 na Estação Marinha de Aquicultura (EMA/FURG).

Na Figura 2 podemos observar as brânquias de *M. liza* provenientes de uma infestação severa, quando foram coletados os parasitas utilizados na preparação da vacina e também no desafio com tomites de *A. ocellatum*.

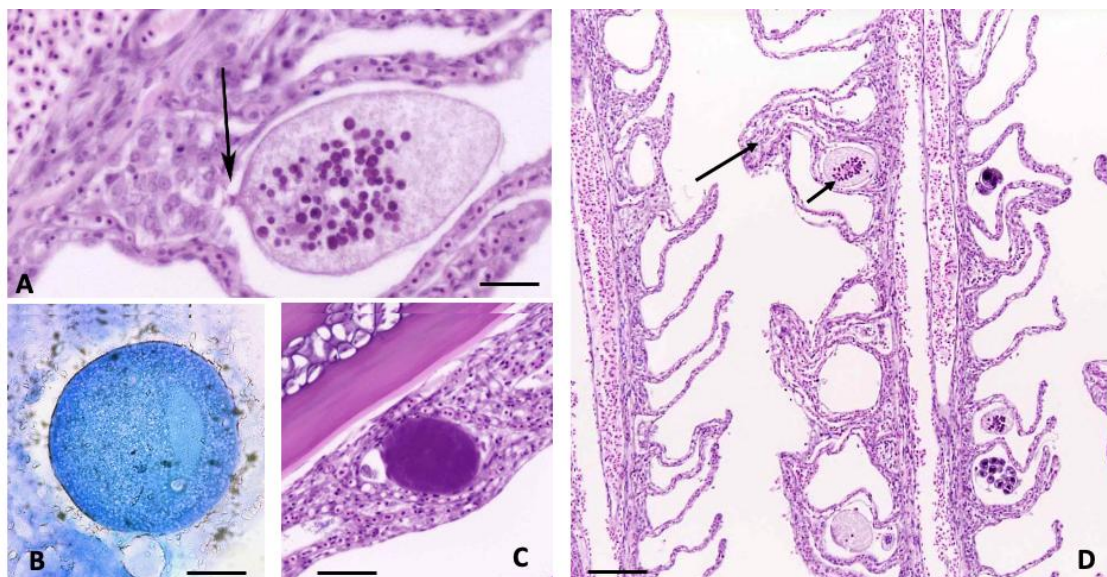


Figura 2: Brânquias de *M. liza* apresentando infestação massiva de *A. ocellatum*, em que foram coletados os parasitas utilizados para a preparação da vacina. **A :** Brânquia com hiperplasia, onde se pode observar um trofote de *Amyloodinium ocellatum* aderido à brânquia (seta). H.E.: BAR=20; **B:** Tomonte no meio branquial. Giemsa: BAR=20; **C:** Epitélio branquial hiperplásico com um tomonte rodeado por células hiperplásicas (seta). H.E.: BAR= 20; **D:** Lamelas branquiais com parasitas em diferentes estados de maturação (seta curta) hiperplasia do epitélio das lamelas (seta longa) HE: BAR=200.

Os trofontes de *A. ocellatum* foram coletados das brânquias de 20 animais e colocados em água marinha filtrada (30g/L). Após atingirem o estágio de tomonte, foram colocados em m tubos estéreis (2 ml) contendo 1 ml de Percoll. A solução foi centrifugada por 5 min a 180 x g, para separar os resíduos dos tomites (adaptado de Beraldo *et al.*, 2021).

O sobrenadante foi então removido e os tomites lavados cinco vezes por centrifugação (5 min a 800 x g), com 2 ml de solução estéril de água salgada filtrada com antibióticos (amoxicilina (0,5 µg/ml; penicilina/estreptomicina 2%; sulfametoxazol/trimetoprima 0,5 µg/ml e tetraciclina (0,2 µg/ml) para evitar contaminação da amostra por bactérias (Beraldo *et al.*, 2021; Sitjà-Bobadilla e Piazzon, 2021).

Foi realizada uma contagem com auxílio de câmara de contagem Sedgewick-Rafter. Ao atingir o N de 100.000 células, estes foram acrescidos de solução fisiológica 0,9% estéril e dispostos em eppendorfs, contendo 1500 parasitas por ml de solução fisiológica estéril. Foi então realizado o congelamento em *ultrafreezer* com temperatura de -80°C , pelo período de 15 dias.

Logo após esse período, as amostras foram descongeladas e centrifugadas por 5 min a 1000 x g. O sobrenadante foi removido e repetida a lavagem com PBS (pH 7,2) estéril seguida de centrifugação (5 min a 1000 rpm), totalizando 5 lavagens por amostra após o descongelamento, no intuito de remover os resíduos de antibióticos e purificar a amostra.

A vacina desenvolvida obedeceu a concentração de 1500 tomites por ml de PBS (adaptado de Xu *et al.*, 2009). As amostras foram sonicadas (QSonica, LLC, USA) *on ice*, na frequência de 20kHz e amplitude de 50, por 45 segundos. Após, foram envasadas em frascos estéreis próprios para armazenamento de vacinas e refrigeradas por 12h, até a vacinação dos peixes.

3.5 Protocolo de Vacinação

Para essa etapa, os peixes foram mantidos em jejum por 24h, anestesiados (Benzocaína 50mg/L), pesados e, em seguida, higienizados com álcool 70% no local da aplicação da vacina e então injetados com as respectivas soluções.

As tainhas do Tratamento Vacina foram imunizadas individualmente, com a vacina desenvolvida, por via intraperitonal. As tainhas do Tratamento Controle foram injetadas individualmente com PBS (pH 7,2) estéril (Cobb *et al.*, 1998), por via intraperitonal. As injeções intraperitoneais foram aplicadas com auxílio de uma seringa de insulina, na dosagem de 0,2ml/peixe (Anderson, 1974; Mondal e Thomas, 2022).

Os peixes foram acomodados nos tanques e mantidos em jejum por mais 12h, em temperatura 2°C superior à que se encontravam antes da vacinação (Avtalion, 1969; Martins *et al.*, 2011). Não foi observada mortalidade após a aplicação vacinal.

3.6 Desafio com tomontes de *A. ocellatum*

Os parasitas a serem utilizados no Desafio com tomontes de *A. ocellatum* foram mantidos em placas de Petri estéreis contendo água do mar filtrada e antibióticos (amoxicilina (0,5 µg/ml; penicilina/estreptomicina 2%; sulfametoxazol/trimetoprima 0,5 µg/ml e tetraciclina (0,2 µg/ml) (Beraldo *et al.*, 2017) mantidos a 16°C.

No dia 1 do Desafio com tomontes de *A. ocellatum*, foram adicionados parasitas à água dos tanques do Tratamento Vacina e Tratamento Controle. O Desafio consistiu na adição de tomontes na concentração de 10/ml em todos os tanques.

3.7 Parâmetros Zootécnicos

No início do experimento e ao final do experimento foi realizado uma biometria parcial com os peixes, onde foram pesados em balança de precisão de 2 casas decimais.

A taxa de sobrevivência foi calculada conforme a equação a seguir:

$$\text{Sobrevivência} = (\text{Peixes finais} / \text{Peixes iniciais}) \times 100$$

3.8 Coleta e Análise de Amostras

Na finalização do experimento, os peixes foram coletados com o auxílio de um puçá e transferidos para um recipiente com água marinha e eutanasiados com Benzocaína (500 mg/L).

Foi procedida a necrópsia conforme o protocolo utilizado em nosso laboratório (LIPOA-FURG). Foram retirados os 4 arcos branquiais do lado esquerdo de cada peixe e fixados em Bouin por 24 horas, transferidos para álcool 70% após esse período e mantidos em álcool até o processamento. As demais amostras foram fixadas com formol tamponado 20% e mantidos nessa solução por 10 dias. Após esse período foram transferidas para álcool 70% e mantidas até o processamento (Prophet, 1992).

As amostras teciduais previamente fixadas foram processadas em processador automático (LEICA TP1020), incluídas em Paraplast®. Os blocos foram cortados em micrótomo semi-automático (LEICA RM2245). Os cortes teciduais com espessura de

4,5µm foram dispostos em lâminas simples de ponta fosca e corados com hematoxilina e eosina (Luna, 1968) ou Giemsa.

Os tecidos foram observados em microscópio óptico Zeiss Primo Star equipado com uma câmera Axiocam ERC5s - AxionVision (LE).

3.9 Análise Estatística

Foi verificada a normalidade e a homocedasticidade dos dados, utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Uma vez que os pressupostos da ANOVA foram atendidos, foi realizada uma ANOVA de uma via, e após foi realizado o teste post-hoc de Tukey para verificar a diferença entre os tratamentos. Um nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$) foi aplicado em todas as análises. O software utilizado foi o Past.

4 Resultados

4.1 Qualidade de Água

Os valores médios de oxigênio dissolvido (OD), temperatura (C°), salinidade, pH, amônia total (N-AT) e nitrito durante a realização do experimento estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Dados da média dos parâmetros de qualidade da água dos peixes *M. liza* nos tratamentos Vacina e Controle, medidos diariamente durante os 15 dias do período de Imunização e os 26 dias do período correspondente ao Desafio com tomontes de *A. ocellatum*.

	Tratamento Vacina	Tratamento Controle
OD (mg.L ⁻¹)	5,12 ± 0,15	4,96 ± 0,27
Temperatura (°C)	26,83 ± 1,06	26,30 ± 1,45
Salinidade	29,22 ± 1,61	29,47 ± 1,23
pH	7,78 ± 0,02	7,76 ± 0,03
N-AT (mg.L ⁻¹)	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,002
Nitrito (mg.L ⁻¹)	3,17 ± 0,75	2,65 ± 0,12

Foram realizadas correções de alcalinidade quando a análise se encontrava abaixo de 150 mg CaCO₃/L, no intuito de manter a alcalinidade nessa faixa. Foi utilizado bicarbonato de sódio diluído em água marinha filtrada.

4.2 Parâmetros Zootécnicos

Os dados de peso inicial, peso final e sobrevivência são expressos na Tabela 2. A sobrevivência apresentou diferença significativa entre os diferentes tratamentos, sendo 97,73% de sobrevivência no Tratamento Vacina e 20% no Tratamento Controle.

Tabela 2: Dados de Peso Inicial, Peso Final e Sobrevivência dos peixes *M. liza* submetidos aos tratamentos Vacina e Controle.

	Tratamento Vacina	Tratamento Controle
Peso Inicial (g)	9,95±1,24	9,71±0,60
Peso Final (g)	19,00±2,43 ^a	15,35±1,68 ^a
Sobrevivência (%)	97,73±0,47 ^a	20,00±0,57 ^b

Não houve mortalidade nos tratamentos nos 15 dias subsequentes à vacinação. Porém, após o desafio com tomites de *A. ocellatum*, quando foi realizada a inserção dos parasitas nos tanques de cultivo, foi observada a mortalidade dos animais do TC.

Após submetidos ao desafio com tomites de *A. ocellatum*, houve diferença significativa na taxa de mortalidade entre os tratamentos, conforme evidenciado na Figura 3.

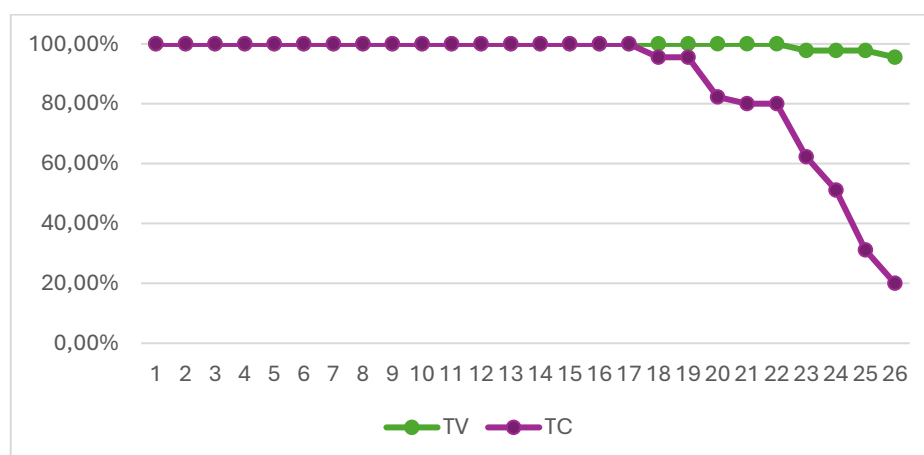


Figura 3: Gráfico comparativo entre a taxa de sobrevivência do Tratamento Controle e Tratamento Vacina durante o período do Desafio com tomites do parasita *A. ocellatum*

Pode-se perceber a sobrevivência de 20% dos animais do Tratamento Controle no dia 26 do Desafio com tomites de *A. ocellatum* e de 97,73% dos exemplares do Tratamento Vacina no mesmo dia.

4.3 Lesões Histopatológicas encontradas nas Brânquias

Após o período de Desafio com tomites de *A. ocellatum*, foram coletados peixes moribundos e analisados cortes teciduais de 3 peixes de cada tanque, totalizando 9 lâminas por tratamento.

Os peixes vacinados apresentaram diferença nas características das brânquias, quando comparados aos peixes que não receberam vacina.

Nos peixes vacinados foram encontradas poucas lesões branquiais, como hiperplasia leve e hiperplasia focal moderada, alguns setores das lamelas secundárias apresentaram desprendimento do epitélio respiratório (Figura 4).

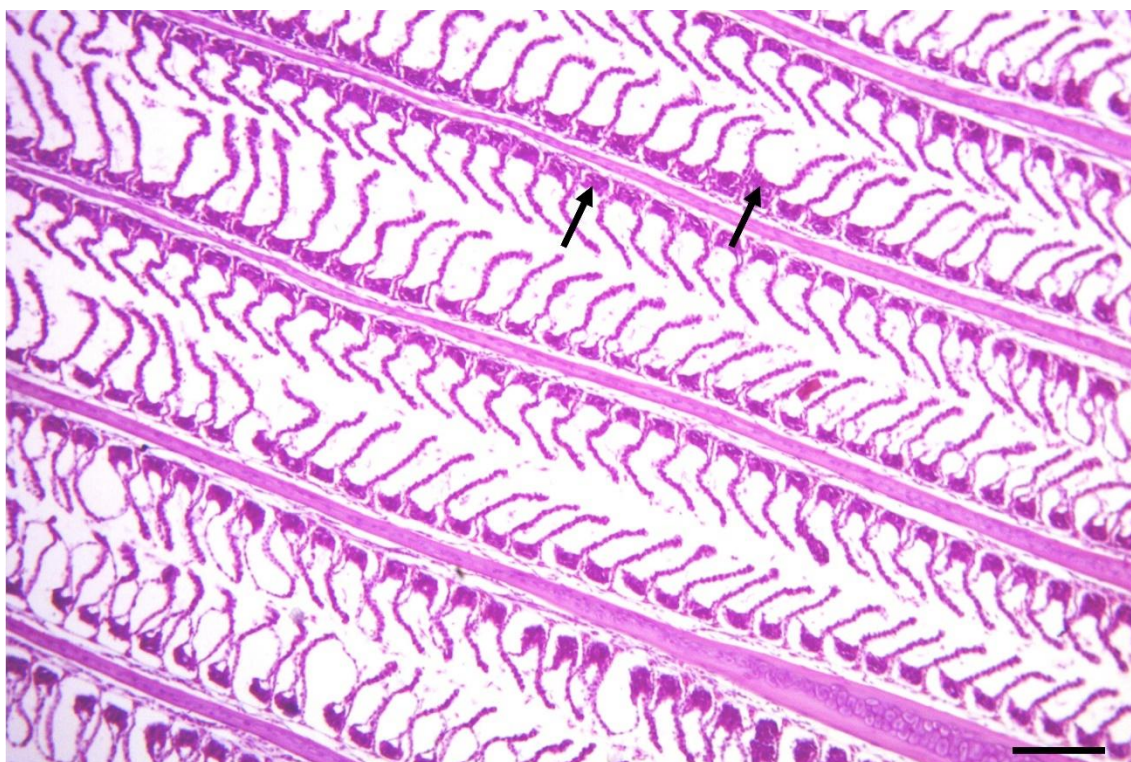


Figura 4: Lamelas branquiais de peixes vacinados, com arquitetura conservada e leve hiperplasia basal (setas) H.E. BAR=200 μ .

Os tanques do Tratamento Controle apresentaram lamelas com hiperplasia proximal e distal difusa moderada a severa, ruptura de células pilares com acúmulo de eritrócitos e necrose focal (Figura 5).

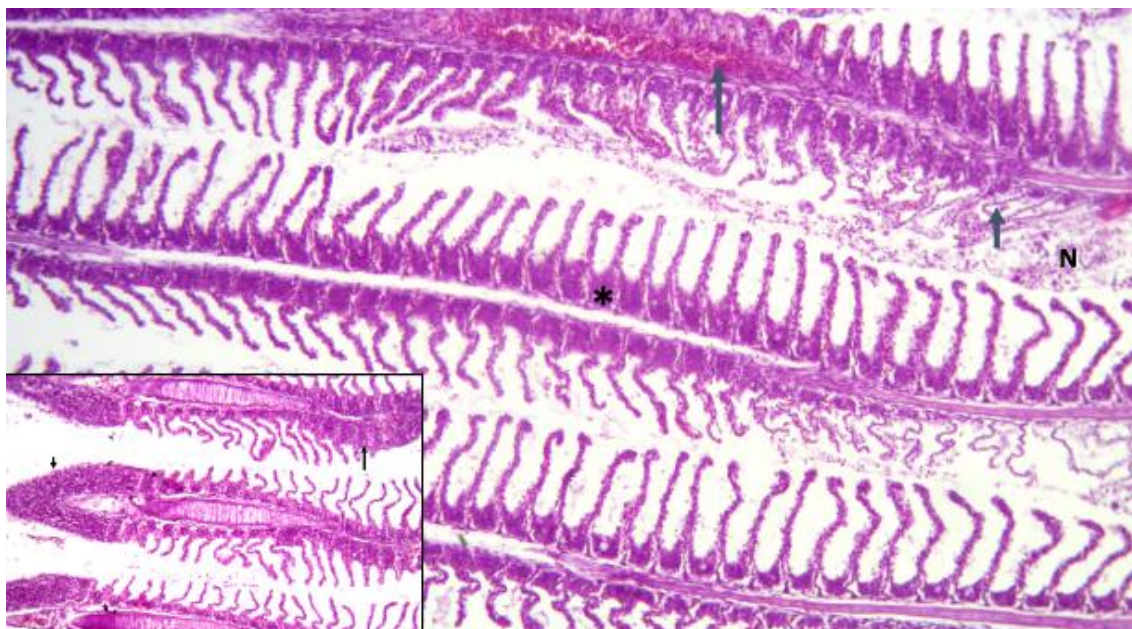


Figura 5: Lamelas branquiais de peixe não vacinado, onde se observa hiperplasia basal (*), necrose focal (N), desprendimento do epitélio respiratório (seta curta) e acúmulo de eritrócitos por ruptura de células pilares (seta longa). H.E. BAR=100 μ . **Insert:** Lamelas secundárias com hiperplasia proximal (seta curta) e distal (seta longa). H.E. BAR=200 μ .

Ademais, as brânquias dos peixes do Tratamento Controle apresentaram dilatação vascular nas lamelas secundárias, ruptura de células pilares (P) e hiperplasia nos ionócitos e de células de revestimento lamelar (Figura 6), necrose focal (N) e a presença de tomonte entre as lamelas (Figura 7).

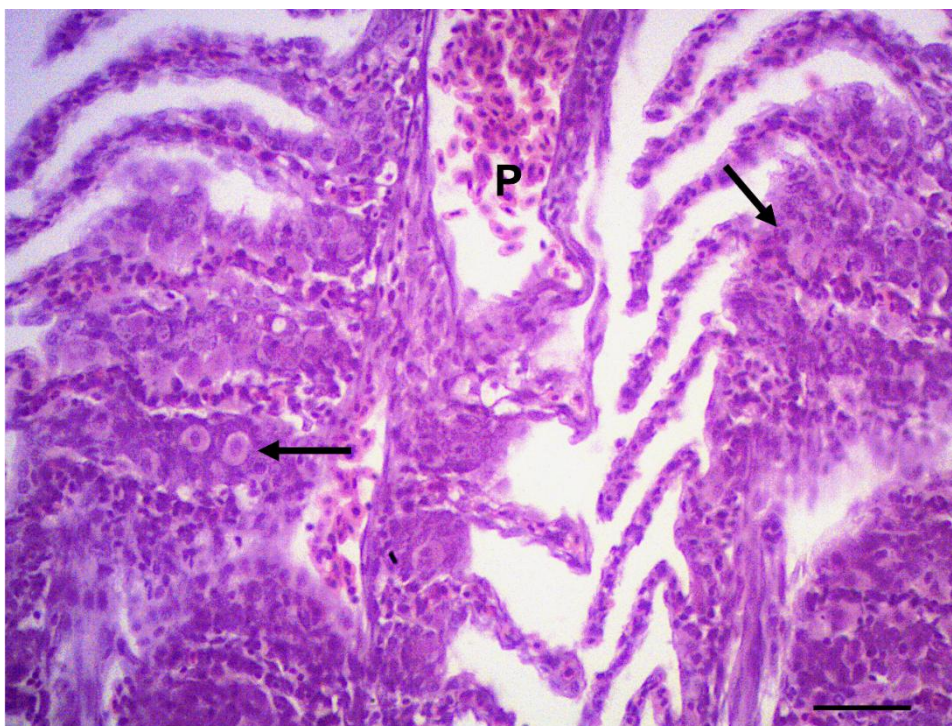


Figura 6: Lamelas branquiais de peixe sem vacinar, com acúmulo de eritrócitos por ruptura de célula pilar (P), hiperplasia dos ionócitos (seta) e células das lamelas secundárias. H.E.= BAR 20 μ .

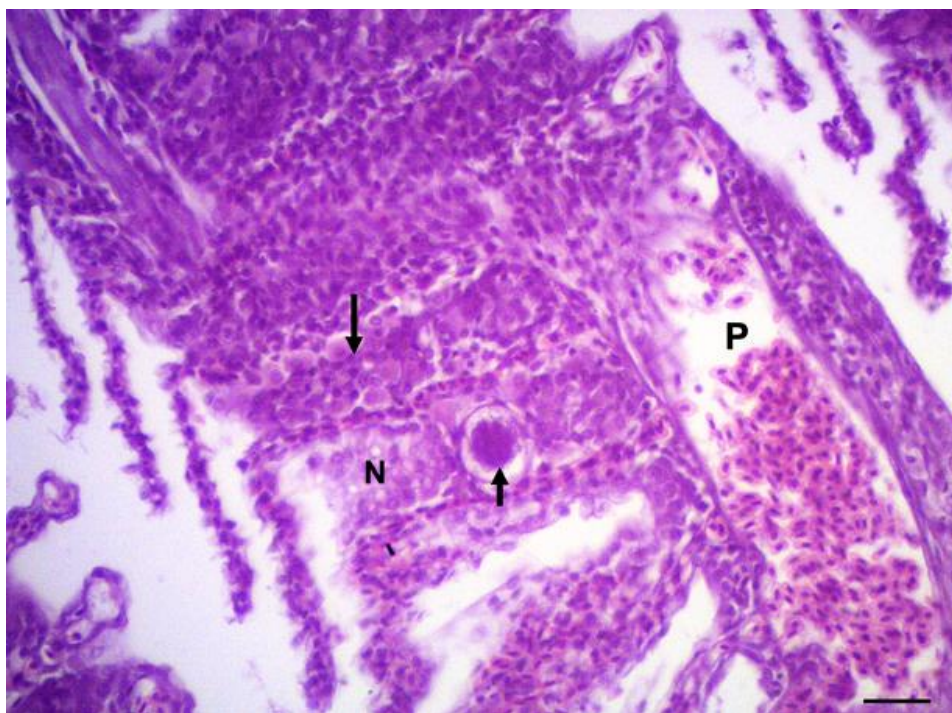


Figura 7: Lamelas branquiais de peixe sem vacinar, onde se pode observar acúmulo de eritrócitos por acúmulo de célula pilar (P), hiperplasia dos ionócitos (seta longa) e células de revestimento lamelar, necrose focal (N) e a presença de tomonte entre as lamelas. H.E.= BAR 20 μ .

As alterações branquiais são consistentes com a parasitose por *A. ocellatum*, e os parasitas encontrados nas brânquias são compatíveis com tomontes em seu estágio reprodutivo avançado.

5 Discussão

No presente estudo, os parâmetros físico-químicos da água permaneceram dentro das concentrações adequadas para a tainha (Sampaio *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2006; Lisboa *et al.*, 2015) e não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Assim, podemos assumir que os parâmetros de qualidade da água não influenciaram significativamente os resultados de sobrevivência entre os tratamentos.

Em relação ao peso inicial e final, não houve diferença significativa entre os tratamentos, conforme a análise estatística. Durante a alimentação, no entanto, observou-se maior voracidade nos animais do TV, bem como maior agilidade na natação. Acredita-se que, devido ao número reduzido de animais sobreviventes no Tratamento Controle, a amostra não tenha sido suficientemente grande para detectar diferenças estatisticamente significativas.

Nas brânquias dos peixes do TC observou-se uma reação tissular exagerada ao parasita, que ocasionou um dano irreversível ao sistema respiratório. Toda a resposta a patógeno gera uma resposta celular e tissular, que quanto maior, mais compromete a funcionalidade do órgão afetado, podendo levar o animal à morte. (Robbins *et al.*, 2010) Nos animais vacinados, a indução do sistema imunológico pela vacina faz com que ocorra a destruição do patógeno antes deste afetar os tecidos, fazendo com que não ocorra a reação tissular exacerbada (Palm e Henry, 2019).

Nos peixes do Tratamento Vacina (TV), não foram observadas lesões nos tecidos branquiais compatíveis com as causadas pelo parasita. Em contrapartida, os peixes do Tratamento Controle (TC) apresentaram alterações histopatológicas típicas de infecção por *A. ocellatum*, conforme relatado por Giesta *et al.* (2023) em estudo prévio com tainhas e por Massimo *et al.* (2022) com pesquisa em *Dicentrarchus labrax*.

Os achados histopatológicos observados neste estudo são consistentes com os descritos por Byadgi *et al.* (2019) e Marques *et al.* (2019) em *D. labrax*; Moreira *et al.* (2017) em *Sparus aurata*; Kumar *et al.* (2015) em *Trachinotus blochi*; Guerra-Santos *et*

al. (2012) em *Rachycentron canadum*; e Vivanco-Aranda *et al.* (2021) em *Seriola dorsalis*. Esses estudos relataram alterações branquiais causadas por *A. ocellatum*, sendo que tais lesões estão associadas ao comprometimento do funcionamento normal das brânquias, o que pode resultar em mortalidade.

De forma análoga, um estudo conduzido por Li *et al.* (2023) demonstrou que os danos branquiais causados por *A. ocellatum* foram responsáveis pela mortalidade dos peixes infectados. A hiperplasia das lamelas primárias e secundárias do epitélio branquial, juntamente com a fusão das lamelas, obstrui o espaço destinado à circulação de água. A ruptura das células pilares impede o fluxo normal de eritrócitos, o que contribui para a hipoxia, como descrito por Schalch *et al.* (2006).

A análise histopatológica revelou alterações nas brânquias que podem comprometer a hematose normal, resultando em hipóxia e anoxia. Embora a morte seja frequentemente atribuída à anoxia, a disfunção osmorregulatória e as infecções secundárias também desempenham papéis significativos nesse processo, conforme sugerido por Noga e Levy (2006), Noga *et al.* (2012) e Martins *et al.* (2015). Dessa forma, existe uma relação etiopatogênica que contribui para a alta mortalidade associada a essas infecções (Anderson e Romano, 1998; Ferguson, 1989).

Durante o Período de Imunização, não foi observada mortalidade após a aplicação da vacina ou do PBS estéril, com 100% de sobrevivência nos animais que receberam a injeção intraperitoneal, durante o período que antecedeu o desafio com tomontes de *A. ocellatum*. É plausível que o manejo associado aos exemplares (aplicação de PBS e vacina) e a pesagem dos peixes tenha sido um fator de estresse aos animais. Embora os animais do grupo TC apresentassem uma taxa de mortalidade elevada, os do grupo TV, que receberam o mesmo protocolo de manejo, demonstraram uma taxa de mortalidade significativamente inferior.

A diferença significativa observada pode ser atribuída à eficácia da vacina. A mortalidade observada nos peixes não vacinados, parasitados por *A. ocellatum*, foi semelhante à reportada por Soeth *et al.* (2013), que registraram uma mortalidade de 82% em juvenis de *Diplodus argenteus* parasitados e mantidos em salinidade 30.

De acordo com Beraldo *et al.* (2021), a carga parasitária de *A. ocellatum* a ser inoculada em experimentos deve ser de aproximadamente 10 dinosporos/ml. No presente estudo, a quantidade de parasitas utilizada foi de 10 tomontes/ml.

Infecções severas costumam resultar em elevada mortalidade, especialmente em altas temperaturas, e apresentam diversos sinais clínicos característicos (Alvarez-Pellitero, 2008). No entanto, infecções leves a moderadas também podem levar à mortalidade, particularmente quando os peixes estão mais suscetíveis à infecção (Noga *et al.*, 2010; Noga *et al.*, 2012).

Xu *et al.* (2009) indicaram que peixes imunizados com trofontes por via intraperitoneal apresentaram infecção leve quando desafiados, com uma taxa de sobrevivência de 93%, valor próximo ao observado no presente estudo. Por outro lado, Swennes *et al.* (2007) conduziram um estudo com diferentes estágios do parasita e relataram que trofontes lisados não conferem imunidade aos peixes. No entanto, trofontes sonificados e fixados em formol resultaram em uma proteção de 65% contra a infecção, conforme Xu *et al.* (2006).

De forma semelhante ao realizado no presente trabalho, Cecchini *et al.* (2001) utilizaram o estágio de tomontes como antígeno e detectaram anticorpos anti-*Amyloodinium* em *D. labrax* vacinados. Byadgi *et al.* (2019) apontam a imunidade adquirida como um fator-chave para induzir resistência ao *A. ocellatum*, mediada pela produção de anticorpos (Cobb *et al.*, 1998), após injeções com estágios de trofontes. Os resultados do nosso estudo sugerem que tomontes submetidos a sonicação e congelamento a -80°C podem ser capazes de gerar antígenos imunogênicos em tainhas, indicando uma possível estratégia de imunização.

De acordo com Farias *et al.* (2020), em estudo realizado com pacus, a vacina contra *A. hydrophila*, preparada a partir de células mortas por formalina e administrada por via intraperitoneal, resultou em maior proteção contra a bacteriose, melhorando as taxas de sobrevivência dos animais. Nesse estudo, a imunização contra *A. hydrophila* promoveu um aumento na resposta imune tanto mucosa quanto sistêmica, envolvendo mecanismos inatos e adaptativos.

Adicionalmente, o soro de peixes imunizados com dinosporos demonstrou ser capaz de aglutinar dinosporos vivos e inativar *A. ocellatum* em cultivo celular (Smith *et al.*, 1993). Nessa linha, Xu *et al.* (2009) comprovaram que bagres imunizados com altas doses de trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* produzem uma resposta imunológica mais robusta, resultando em taxas de sobrevivência significativamente melhores quando comparados a peixes não imunizados ou imunizados com menores quantidades de trofontes.

Com base nos estudos de outros pesquisadores e nos resultados do presente experimento, foi observada a viabilidade do controle imunológico da parasitose. A análise histopatológica revelou danos branquiais que comprometem a função respiratória e favorecem a mortalidade, o que reforça a importância de estratégias de imunização e manejo adequados. Futuros estudos devem investigar diferentes concentrações de antígeno e cargas parasitárias, com o objetivo de otimizar protocolos de vacinação e controle em sistemas de cultivo comercial.

Conclusões

Os resultados indicam que a vacinação com tomontes de *A. ocellatum* tratados por sonicação e congelamento, foi eficaz em promover uma alta taxa de sobrevivência nos peixes, e propõe a viabilidade dessa abordagem como estratégia imunológica. Esse dado sugere a eficácia da vacina e ressalta a importância do manejo adequado na prevenção de infecções parasitárias em espécies comerciais. A análise dos danos branquiais causados pela parasitose, associada à hipoxia e disfunção osmorregulatória, destaca a complexidade da mortalidade induzida pelo parasita.

O presente estudo contribui para o avanço do conhecimento sobre o impacto de *A. ocellatum* em cultivos e no desenvolvimento de alternativas vacinais para a prevenção de amiloodiniose. A identificação das respostas imunológicas, contudo, ainda representa um desafio, assim como a compreensão dos mecanismos subjacentes à imunidade (Munang'andu *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS

- Alvarez-Pellitero, P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary immunology and immunopathology*, 126(3-4), 171-198. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.013>
- Aminot, A., Chaussepied, M., Barbosa, F., 2010. BAUMGARTEN, MGZ; WALLNER-KERSANACH, M. NIENCHESKI, LFH Manual de Análises em Oceanografia Química. Segunda edição. Ed. da FURG. Rio Grande.
- Anderson, D.P., 1974. Fish immunology. ISBN 0-87666-036-7 Paginas 239
- Assefa, A., Abunna, F., 2018. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary medicine international*, 2018(1), 5432497. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Avtalion, R.R., 1969. Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). *Immun.* 17: 927-931.
- Baird, R., Rice, E., Eaton, A., 2017. Standard methods for the examination of water and wastewaters. Water Environment Federation, Chair Eugene W. Rice, American Public Health Association Andrew D. Eaton, American Water Works Association, 1, 71-90.
- Baldisserotto, B., Gomes, L.C., 2010. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Editora UFSM, Santa Maria, 606p.
- Beraldo, P., Massimo, M., Galeotti, M. Amyloodinium ocellatum. In: Sitjà-Bobadilla, A., Piazzon, M.C., 2021. Fish parasites: a handbook of protocols for their isolation, culture and transmission. 5m Books Ltd.
- Beraldo, P., Byadgi, O.V., Massimo, M., Bulfon, C., Volpatti, D., Galeotti, M., 2017. Grave episodio di amyloodiniosi in giovanili di branzino (*Dicentrarchus labrax*): analisi dei determinanti di malattia e rilievi anatomopatologici. In Atti del XXIII Convegno Nazionale Società Italiana di Patologia Ittica (pp. 30-30).

Boehm, T., Iwanami, N., & Hess, I., 2012. Evolution of the immune system in the lower vertebrates. *Annual review of genomics and human genetics*, 13(1), 127-149. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163747>

Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. 2015. Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Tainha, *Mugil Liza Valenciennes*, 1836, No Sudeste E Sul Do Brasil. Brasília.

Brown, E.M. 1931. Note on a new species of dinoflagellate from the gills and epidermis of marine fish. *Proceedings of the Zoological Society London*, 1: 345-346.

Brown, E.M.; Hovasse, R. 1946. *Amyloodinium ocellatum* (Brown), a peridinian parasitic on marine fishes: a complementary study. *Proc Zool Soc Lond.*, 116: 33–46.

Byadgi, O., Beraldo, P., Volpatti, D., Massimo, M., Bulfon, C., Galeotti, M., 2019. Expression of infection related immune response in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during a natural outbreak from a unique dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84:62–72. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.069>.

Byadgi, O., Massimo, M., Dirks, R.P., Pallavicini, A., Bron, J.E., Ireland, J.H., ... Beraldo, P., 2021. Innate immune-gene expression during experimental amyloodiniosis in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 234, 110217. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2021.110217>

Cecchini, S., Saroglia, M., Terova, G., Albanesi, F., 2001. Detection of antibody response against *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) in serum of naturally infected European sea bass by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 21(3), 104.

Cobb, C.S. Levy, M.G., Noga, E.J., 1998. Acquired immunity to amyloodiniosis is associated with an antibody response. *Dis. Aquat. Org.*, 34: 125-133, 1998.

da Costa, M. R., Martins, R.R.M., Tomás, A.R.G., de Almeida Tubino, R., Monteiro-Neto, C., 2021. Biological aspects of *Mugil liza Valenciennes*, 1836 in a tropical estuarine bay in the southwestern Atlantic. *Regional Studies in Marine Science*, 43, 101651.

Dalgaard, M., Buchmann, K., Li, A., 2002. Immunization of rainbow trout fry with *Ichthyophthirius multifiliis* sonicate: protection of host and immunological changes. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 22(5), 288-297.

de Medeiros, A.F.F., Pedrosa, V.F., Romano, L.A., 2021. Ultrastructural study of the thymus of *Mugil liza* Valenciennes, 1836 juveniles. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2020.100005>

Dixon, B., & Stet, R. J. M. (2001). The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 683-699. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00030-1)

Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington.

FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2023 - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Farias, T.H.V., Arijo, S., Medina, A., Pala, G., da Rosa Prado, E.J., Montassier, H.J., ... de Andrade Belo, M.A., 2020. Immune responses induced by inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Fish & shellfish immunology*, 101, 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.059>.

Ferguson, H.W., 1989. Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts (pp. 263-pp).

Francis-Floyd, R.; Floyd, M.R., 2011. *Amyloodinium ocellatum*, an important parasite of cultured marine fish. SRAC, Publication n.4705, July 2011.

Giesta, L. B., dos Santos, P. A. D. P., Okamoto, M., Pedrosa, V. F. & Romano, L. A. R. (2023). Histopathological effects of *Amyloodinium ocellatum* (E.-M. Brown) E.-M. Brown & Hovasse, 1946 (Alveolata: Dinophyseae) on the gills of *Mugil liza* (Valenciennes, 1836). *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 5(2), 3.

Guerra-Santos, B., Albinati, R.C.B., Moreira E.L.T., Lima F.W.M., Azevedo T.M.P., Costa, D.S.P., De Medeiros, S.D.C., Lira, A.D., 2012. Parâmetros hematológicos e alterações histopatológicas em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com

amyloodiniose. Pesquisa Veterinária Brasileira 32(11):1184-1190.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100019>

Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H., 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem, 29: 577-585.

Jiang, S., 2010. Aquaculture, capture fisheries, and wild fish stocks. Resource and Energy Economics, 32(1), 65-77. <https://doi.org/10.1016/j.reseneeco.2009.06.002>

Kumar, P.R.; Nazar, A.K.A.; Jayakumar, R., Tamilmani, G., Sakthivel, M., Kalidas, C., Balamurugan, V., Sirajudeen, S., Thiagu, R., Gopakumar, G., 2015. Amyloodinium ocellatum infestation in the broodstock of silver pompano *Trachinotus blochii* (Lacepede, 1801) and its therapeutic control. Indian Journal of Fisheries 62:131-134.

Lawler, A.R., 1977. Dinoflagellate (*Amyloodinium*) infestation of pompano. In: Sinderman CJ (ed) Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Elsevier, Amsterdam, p. 257-264.

Lawler, A.R., 1980. Studies on *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellata) in Mississippi Sound: natural and experimental hosts. Gulf Res Rep., 6: 403-413.

Lemos, V.M., Varela Jr, A.S., Schwingel, P.R., Muelbert, J.H., Vieira, J.P., 2014. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. Journal of fish biology, 85(3), 671-687. <https://doi.org/10.1111/jfb.12452>

Levy, M. G., Poore, M. F., Colorni, A., Noga, E. J., Vandersea, M. W., & Litaker, R. W. (2007). A highly specific PCR assay for detecting the fish ectoparasite *Amyloodinium ocellatum*. Diseases of Aquatic Organisms, 73(3), 219-226. <https://doi.org/10.3354/dao073219>

Li, Z., Zhuang, J., Wang, H., Cao, J., Han, Q., Luo, Z., ... Li, A., 2024. Gill lesions are the main cause of death in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) following infection with *Amyloodinium ocellatum*. Microbial Pathogenesis, 194, 106845. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106845>

Lisboa, V., Barcarolli, I.F., Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2015. Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza*

(Perciformes: Mugilidae). Neotropical Ichthyology, 13(2), 447-452.
<https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140122>

Luna, L.G. (1968) Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition, McGraw-Hill, New York.

Ma, J., Bruce, T.J., Jones, E.M., Cain, K.D., 2019. A review of fish vaccine development strategies: conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms*, 7(11), 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>

Mai, A.C., Santos, M.L.D., Lemos, V.M., Vieira, J.P., 2018. Discrimination of habitat use between two sympatric species of mullets, *Mugil curema* and *Mugil liza* (Mugiliformes: Mugilidae) in the rio Tramandaí Estuary, determined by otolith chemistry. *Neotropical Ichthyology*, 16, e170045. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170045>

Mai A.C.G., Albuquerque C.Q., Lemos V.M., et al. 2019. Coastal zone use and migratory behavior of the southern population of *Mugil liza* in Brazil. *J. Fish. Biol.* <https://doi.org/10.1111/jfb.14120>

Mafra, E.O., de Oliveira, R., de Quadro, M.F.L., 2020. A influência da variação zonal da confluência Brasil-Malvinas na safra da tainha no estado de Santa Catarina entre os anos 2006 a 2016. *Ciência e Natura*, 42, e13-e13. <https://doi.org/10.5902/2179460X55314>

Massimo, M., Volpatti, D., Galeotti, M., Bron, J.E., Beraldo, P., 2022. News insights into the host-parasite interactions of amyloodiniosis in European sea bass: a multi-modal approach. *Pathogens*, 11(1), 62. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010062>

Martins, M.L.; Xu, D.-H.; Shoemaker, C.A.; Klesius, P.H., 2011. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31:774-780. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.015>

Martins, M.L.; Cardoso, L.; Marchiori, N.; Pádua, S.B. de., 2015. Protozoan infections in farmed fish from Brazil: diagnosis and pathogenesis. *Braz.J.Vet.Parasitol.*, Jaboticabal, v. 24, n. 1: 1-20. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015013>

Marques, C. L., Medeiros, A., Moreira, M., Quental-Ferreira, H., Mendes, A. C., Pousão-Ferreira, P., Soares, F., 2019. Report and genetic identification of *Amyloodinium*

ocellatum in a sea bass (*Dicentrarchus labrax*) broodstock in Portugal, *Aquaculture Reports*, 14:100191. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100191>.

Meng-Han, C., 2024. Fish oral vaccine and mucosal immunity. *Aquaculture International*, 32(2), 1335-1348. <https://doi.org/10.meg1007/s10499-023-01219-z>

Menezes, N.A; Figueiredo, J.L., 1985. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. São Paulo: Museu de Zoologia da USP, 105 p.

Menezes, N.A.; Nirchio, M.; De Oliveira, C.; Siccharamirez, R., 2015. Taxonomic review of the species of *Mugil* (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the Atlantic South Caribbean and South America, with integration of morphological, cytogenetic and molecular data. *Zootaxa*, p. 1- 38.

Ministério da Pesca e Aquicultura, Ministério do Meio Ambiente., 2015. Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, *Mugil liza* Valenciennes, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil.

Mondal, Haimanti; Thomas, John. A review on the recent advances and application of vaccines against fish pathogens in aquaculture. *Aquaculture international*, v. 30, n. 4, p. 1971-2000, 2022.

Moreira, M.; Schrama, D.; Soares, F.; Wulff, T.; Pousao-Ferreira, P. ;Rodrigues, P., 2017. Physiological responses of reared sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) to an *Amyloodinium ocellatum* outbreak, *Journal of Fish Diseases* 40: 1545–1560. <https://doi.org/10.1111/jfd.12623>

Moreira, M., Herrera, M., Pouso-Ferreira, P., Triano, J. I. N., & Soares, F., 2018. Stress effects of amyloodiniosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Diseases of Aquatic Organisms*, 127(3), 201–211. <https://doi.org/10.3354/dao03199>

Moreira, M., Cordeiro-Silva, A., Barata, M., Pousao-Ferreira, P., & Soares, F. 2019., Influence of age on stress responses of white seabream to amyloodiniosis. *Fishes*, 4(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/fishes4020026>

Munang'andu, H.M., Salinas, I., Tafalla, C., Dalmo, R.A., 2020. Vaccines and immunostimulants for finfish. *Frontiers in Immunology*, 11, 573771. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.573771>

- Muñoz-Atienza, E., Díaz-Rosales, P., Tafalla, C., 2021. Systemic and mucosal B and T cell responses upon mucosal vaccination of teleost fish. *Frontiers in Immunology*, 11, 622377. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.622377>
- Nigrelli, R.F., 1936. The morphology, cytology, and life history of *Oodinium ocellatum* Brown, a dinoflagellate parasitic on marine fishes. *Zoológica*, 21:129-164.
- Noga, E.J., & Levy, M.G., 2006. Phylum Dinoflagellata. *Fish diseases and disorders*. Volume 1: protozoan and metazoan infections, 16-45. <https://doi.org/10.1079/9780851990156.0016>
- Noga, E.J., 2010. *Fish Disease: Diagnosis and treatment*. Second Edition. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 519p
- Noga, E. J. 2012. *Amyloodinium ocellatum*. In *Fish parasites: Pathobiology and protection* (pp. 19-29). Wallingford UK: CABI.
- Okamoto, M.H., de Sampaio, L.A.N., de Pinho Maçada, A., 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica (Rio Grande)*, 28(1), 61-66. <https://doi.org/10.5088/atlantica.v28i1.1728>
- Palm, A.K.E., Henry, C., 2019. Remembrance of things past: long-term B cell memory after infection and vaccination. *Frontiers in immunology*, 10, 1787. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01787>
- Paperna, I., 1980. *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology. *J Fish Dis.*, 3: 363-372.
- Paperna, I., 1984. Reproduction cycle and tolerance to temperature and salinity of *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 59(1): 7-30, 1984.
- Peeler, E.J., Taylor, N.G., 2011. A aplicação da epidemiologia na saúde de animais aquáticos — oportunidades e desafios. *Veterinary Research* , 42 (1), 94. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-94>

Peixe Br, 2024. Anuario Brasileiro da Piscicultura Peixe Br 2024. <https://www.peixebr.com.br/anuario-2024/> (Acessado em 08 de fevereiro de 2025).

Phonlor, G., Vinagre, L.E.C., 1989. Efeito do retarded a primeira alimentação sobre o crescimento e a sobrevivência da larva de *Odontesthes argentinensis*. *Atlântica* 11, 63-75.

Prophet, E.B.; Mills, B.; Arrington, J.B.; Sobin, L.H., 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washintong: Amer Registry Of Pathology, 289 p.

Rai S, Kaur B, Singh P, Singh A, Benjakul So, Reddy SVK, Nagar V, Tyagi A (2023) Perspectives on phage therapy for health management in aquaculture. *Aquacult Int*. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01173-w>

Ramos, P., Oliveira, J.M., 2001. Amiloodiniose em pregado, *Psetta máxima* (L.). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96(540), 201-205.

Ramos, L.R.V., Monserrat, J.M., Romano, L.A., Sampaio, L.A., Abreu, P.C., Tesser, M.B., 2015. Effects of supplementing the diets of *Mugil liza* Valenciennes, 1836 juveniles with citrus pectin. *Journal of Applied Ichthyology* 31, 362-369. <https://doi.org/10.1111/jai.12695>

Rico, A., Satapornvanit, K., Haque, M.M., Min, J., Nguyen, P.T., Telfer, T.C., van den Brink, P. J., 2012. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 75-93. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01062.x>

Robbins, K. V., Kumar, V., & Abbas, A. K. (2010). Cotran pathologic basis of disease. *Am. J. Surg. Pathol*, 34(1), 132.

Roberts-Thomson, A., Barnes, A., Fielder, D.S., Lester, R.J., Adlard, R.D., 2006. Aerosol dispersal of the fish pathogen, *Amyloodinium ocellatum*. *Aquaculture*, 257(1-4), 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.058>

Romano, L.A.; Marozzi, V.; Zenobi, C., 2004. Utilización de anticuerpos humanos en la marcación de receptores CD3 y CD4 de linfocitos en *Xiphophorus helleri*. *Soc Cient Argent*, n. 43, p.123-127.

ROMANO, LUIS ALBERTO; OLIVEIRA, FERNANDO PABLO SILVA ; PEDROSA, VIRGÍNIA FONSECA . Mast cells and eosinophilic granule cells in *Oncorhynchus mykiss*: Are they similar or different?. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, v. 2, p. 100029-7, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2021.100029>

Sampaio, L.A., Wasielesky, W., Miranda-Filho, K.C., 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to Juvenile *Mugil platanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 68, 668-674. <https://doi.org/10.1007/s001280306>.

Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2008. Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquaculture Research* 39, 712-717. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01923.x>

Sampaio, L.A., Burkert, D., Santos, F.M., Streit Junior, D., Tesser, M.B., 2011. Avaliação do potencial de criação da corvina (*Micropogonias furnieri*) em tanque rede no estuário da Lagoa dos Patos. *Atlântica* 33, 65-71.

Schalch, E. H., de Moraes, F. R., & de Moraes, J. R. (2006). Efeitos do parasitismo sobre a estrutura branquial de *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britsk, 1988 (Anastomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária= Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 110-115.

Shinn, A.P., Pratoomyot, J., Bron, J.E., Paladini, G., Brooker, E.E., Brooker, A.J., 2015. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology*, 142(1), 196-270. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001437>

Sitjà-Bobadilla, A., Piazzon, M.C. (Eds.), 2021. Fish parasites: a handbook of protocols for their isolation, culture and transmission. 5m Books Ltd.

Smith, S.A.; Noga, E.J.; Levy, M.G.; Gerig, T.M., 1993. Effect of immune serum from tilapia *Oreochromis aureus*, immunized with dinospores of *Amyloodinium ocellatum* on the motility, infectivity and growth in cell culture. *Dis Aquat Org.*, 15:73-80.

- Soares, F., Quental-Ferreira, H., Moreira, M., Cunha, E., Ribeiro, L., Pousão-Ferreira, P., 2012. First report of *Amyloodinium ocellatum* in farmed meagre (*Argyrosomus regius*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*, 32, 30-33.
- Soeth, M.; Lima, L.C.; Daros, F.A., 2013. Amiloodiniose em juvenis de *Diplodus argenteus* (Sparidae) mantidos em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 39(1): 45 – 51.
- Swennes, A.G., Findly, R.C., Dickerson, H.W., 2007. Cross-immunity and antibody responses to different immobilisation serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & shellfish immunology*, 22(6), 589-597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.07.005>
- Takamura, S., 2018. Niches for the long-term maintenance of tissue-resident memory T cells. *Frontiers in immunology*, 9, 1214. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01214>
- Unesco., 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commissiony. Paris, France.
- Vivanco-Aranda, M., Del Río-Zaragoza, O. B., Lechuga-Sandoval, C. E., Viana, M. T., & Rombenso, A. N., 2018. Health response in yellowtail *Seriola dorsalis* exposed to an *Amyloodinium ocellatum* outbreak. *Ciencias marinas*, 44(4), 267-277. <https://doi.org/10.7773/cm.v44i4.2858>
- Wang C, Li Z, Wang T, Xu X, Zhang X, Li D., 2021. Intelligent fish farm-the future of aquaculture. *Aquacult Int* 29:2681–2711
- Woo, P. T. K., 2007. Protective immunity in fish against protozoan diseases. *Parassitologia*, 49(3), 185.
- Xu, D.H., Klesius, P.H., Panangala, V.S., 2006. Induced cross-protection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against different immobilization serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Fish Diseases*, 29(3), 131-138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00700.x>
- Xu, D.-H.; Klesius, P.H.; Shoemaker, C.A., 2009. Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26:614–618. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.015>

Yue, G.H., Lin, H.R., Li, J.L., 2016. Tilapia is the fish for next-generation aquaculture. *International Journal of Marine Science and Ocean Technology*, 3(1), 11-13.

Zens, K.D., Chen, J.K., Farber, D.L., 2016. Vaccine-generated lung tissue–resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection. *JCI insight*, 1(10). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85832>

Zhao, J., Zhao, J., Mangalam, A.K., Channappanavar, R., Fett, C., Meyerholz, D.K., ... Perlman, S., 2016. Airway memory CD4⁺ T cells mediate protective immunity against emerging respiratory coronaviruses. *Immunity*, 44(6), 1379-1391. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.006>