



CURSO DE MEDICINA VETERINARIA

LETICIA FRANCHIN RODRIGUES

**ESTUDO COMPARATIVO DE AEROCISTITE AGUDA POR BACTERINAS E
INÓCULOS VIVOS *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS DO NILO,
Oreochormis niloticus.**

**DESCALVADO - SP
2018**



CURSO DE MEDICINA VETERINARIA

Leticia Franchin Rodrigues

**ESTUDO COMPARATIVO DE AEROCISTITE AGUDA POR BACTERINAS E
INÓCULOS VIVOS *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS DO NILO,
Oreochromis niloticus.**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Brasil campus Descalvado como parte das exigências para a conclusão do curso de graduação e obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

DESCALVADO – SP
2018

R614e Rodrigues, Leticia Franchin
Estudo comparativo de aerocistite aguda por bacterinas e inóculos vivos *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo, *Oreochormis niloticus* / Leticia Franchin Rodrigues. – Descalvado, 2018.
31f. : il. ; 29,5cm.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Brasil - Campus Descalvado - SP.

Orientador: Prof^o Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

1. Ciclídios.
 2. Inflamação aguda.
 3. Hematologia.
 4. Bioquímica sérica.
 5. Resposta somática.
- I. Título.

CDD 639.3

Dedico em primeiro lugar a Deus, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, e a minha família, que acreditaram e investiram em mim.

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, que me deu força e energia para realizar esse sonho.

Agradeço aos meus pais Eliel e Silvia que batalharam muito para me oferecer uma educação de qualidade e sempre estiveram ao meu lado me incentivando. À minha irmã Larissa que sempre esteve me incentivando e dando força.

Ao meu namorado Leonardo que foi compreensivo com os momentos em que permaneci distante, e nunca me negou carinho, incentivo e força.

Não posso deixar de agradecer a todos os professores, e em especial o meu orientador, Prof Dr. Marco Belo por sua confiança e incansável dedicação, você nunca perdeu a fé na minha pesquisa e soube me amparar nos momentos mais difíceis.

Sou grata a esta universidade, desde o pessoal do administrativo até o coordenador do curso, que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Meu eterno agradecimento as minhas eternas amigas Mayumi e Julia, por sempre estarmos unidas durante todo o curso, que nossa amizade seja eterna.

RESUMO

Partindo do significativo crescimento da atividade piscícola na economia brasileira e da necessidade de se compreender os mecanismos de defesa dos peixes para auxiliar no manejo sanitário das criações, esta investigação teve por objetivos avaliar a evolução da reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, através de aerocistite induzida por bacterina ou pela inoculação de *Streptococcus agalactiae* viva. Para tal, foram utilizadas 56 tilápias, jovens, acondicionados em 7 aquários (n=8), com capacidade de 100 L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano com vazão de 1 L/min., sendo constituídos os seguintes tratamentos: T1 (inoculado com bacterina de *S. agalactiae*) e T2 (inoculado com *S. agalactiae* viva). Foram avaliados oito animais por tratamento em três períodos, isto é: seis, 24 e 48 horas pós-inoculação, totalizando 6 grupos para colheita do exsudato presente na bexiga natatória e de amostras de sangue para determinação do hemograma, um sétimo grupo de 8 peixes foi avaliado sem ser submetido a nenhum tipo de estímulo para obtenção dos valores de referência (padrão fisiológico). O estudo da reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo, *O. niloticus*, em aerocistite induzida por bacterina ou pela inoculação de *S. agalactiae* vivos revelou trombocitopenia e leucopenia com marcada linfopenia e neutropenia, sendo estes achados mais significativos em peixes inoculados com a bactéria viva. A reação inflamatória resultou em aumento de hemoglobina, VCM e CHCM, associado ao aumento sérico de proteínas, glicose e diminuição somática esplênica, demonstrando o estresse que representou o estímulo inflamatório aos peixes.

Palavras chave: ciclídios, inflamação aguda, hematologia, bioquímica sérica, resposta somática.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the evolution of the acute inflammatory reaction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in order to evaluate the evolution of the fish ' through bacterin-induced aerocystitis or by the inoculation of live *Streptococcus agalactiae*. For this purpose, 56 young tilapia were used, packed in 7 aquariums (n = 8), with a capacity of 100 L of water each, supplied with running water devoid of chlorine, from artesian well with flow rate of 1 L / min, the following treatments were used: T1 (inoculated with *S. agalactiae* bacterin) and T2 (inoculated with *S. agalactiae* alive). Eight animals were evaluated per treatment in three periods, ie: six, 24 and 48 hours after inoculation, totalizing 6 groups to collect the exudate present in the swim bladder and blood samples to determine the blood count, a seventh group of 8 fish was evaluated without being submitted to any type of stimulus to obtain the reference values (physiological standard). The study of the acute inflammatory reaction in Nile tilapia, *O. niloticus*, bacterin-induced aerocystitis or inoculation of live *S. agalactiae* revealed thrombocytopenia and leucopenia with marked lymphopenia and neutropenia, these findings being more significant in fish inoculated with live bacteria . The inflammatory reaction resulted in an increase in hemoglobin, VCM and CHCM, associated to serum protein, glucose and somatic splenic decrease, demonstrating the stress that represented the inflammatory stimulus to fish.

Key words: cyclids, acute inflammation, hematology, serum biochemistry, somatic response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Peixes pré-anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína (10:10.000) para a administração da bacterina e de *Streptococcus agalactiae* viva; (B) Peixe (*Oerochromis niloticus*) anestesiado por imersão em solução aquosa de benzocaína (1:500) para eutanásia.....16

Figura 2: (A) Peixe (*Oerochromis niloticus*) anestesiado por imersão em solução aquosa de benzocaína (1:10.000) para a administração do inoculo de *Streptococcus agalactiae*.(B) Administração do inóculo na bexiga natatória.....16

Figura 3: Fracos contendo bactéria e bacterina de *Streptococcus agalactiae* que vão ser inoculados nos peixes (*Oerochromis niloticus*).....17

Figura 4: (A) Coleta de sangue do vaso caudal para realização das análises; (B) Extensão sanguínea para a contagem diferencial de leucócitos; (C) Colocando o sangue na solução de Natt e Herrick com diluente na proporção de 1:100, para contagem global de células vermelhas e brancas foram realizadas em câmara de Neubauer; (D) Realização do capilar para determinar o percentual de hematócrito.....19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das tilápias (<i>Oerochromis niloticus</i>) nos diferentes tratamentos para estudos da inflamação aguda.....	15
Tabela 2. Valores médios ¹ (\pm SE) e ANOVA ² das contagens total e diferencial de leucócitos observados em tilápias (<i>Oerochromis niloticus</i>) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.....	21
Tabela 3. Valores médios ¹ (\pm SE) e ANOVA ² das contagens relativas (percentuais) de leucócitos observados em tilápias (<i>Oerochromis niloticus</i>) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.....	22
Tabela 4. Valores médios ¹ (\pm SE) e ANOVA ² observados no estudo eritrocitário das tilápias (<i>Oerochromis niloticus</i>) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.....	23
Tabela 5. Valores médios ¹ (\pm SE) e ANOVA ² observados no estudo somático de coração, fígado, baço e rim cranial das tilápias (<i>Oerochromis niloticus</i>) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.....	24
Tabela 6. Valores médios ¹ (\pm SE) e ANOVA ² observados no estudo bioquímico sérico de proteínas e glicose das tilápias (<i>Oerochromis niloticus</i>) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% Por cento

< menor

± mais ou menos

°C Graus celsius

µg Microgramas

µL Microlitro

1:10.000 proporção de uma parte para 10.000 partes

1:500 proporção de uma parte para 500 partes

BHI (Brain Heart Infusion)

CHCM concentração hemoglobina corpuscular média

CV- Coeficiente de Variação

DL50 Dose letal mediana

DP Desvio padrão

g Gramas

HE Hemoglobina

HPD Horas pós desafio

HT Hematocrito

Kg Quilogramas

L Litro

Min Minuto

mL mililitro

NaCl Cloreto de sódio

NS - Não significativo

pH potencial de hidrogênio

Rpm rotação por minuto

T0 Tratamento controle

T1 Inoculação de bacterina

T2 Inoculação de *Streptococcus agalactiae*

VCM volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVO GERAL.....	12
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
5.1 Tilapicultura no Brasil.....	12
5.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	13
5.3 Inflamação aguda.....	14
6. MATERIAL E METODOS.....	14
6.1 Peixes e acondicionamento.....	14
6.2 Delineamento experimental.....	15
6.3 Anestesia dos peixes.....	15
6.4 Indução do processo inflamatório.....	16
6.5 Isolamento do <i>Streptococcus agalactiae</i> e infecção experimental.....	16
6.7 Produção da bacterina contra <i>S. agalactiae</i>	17
6.8 Avaliação do eritrograma, contagem total e diferencial de leucócitos.....	18
4.9 Avaliação hematológica.....	18
4.10 Monitoramento da qualidade da água e sinais clínicos.....	19
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
8. CONCLUSÃO.....	26
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

O SOFIA (2018) prevê que, até 2030, a região cresça 24,2% na produção pesqueira (pesca e aquicultura), passando de 12,9 milhões de toneladas para 16 milhões de toneladas. Em 2016 a produção global aquícola (incluindo plantas aquáticas) foi de 110,2 milhões de toneladas, estimando-se um valor comercial de primeira venda em 243.500 milhões de dólares. Mais uma vez, o grupo mais produzido foi o de peixes com 54,1 milhões de toneladas, seguido de algas, com 30,1 milhões de toneladas, moluscos com 17,1 milhões de toneladas e crustáceos com 7,9 milhões de toneladas produzidas (SOFIA 2018).

Neste contexto, destaca-se tilapicultura, devido à elevada precocidade e rusticidade da tilápia, além também da sua carne ser altamente apreciada pelo consumidor. A biomanipulação dos ecossistemas aquáticos com a maximização dos recursos produtivos traz consigo inúmeros desafios, dentre os quais se destaca o controle sanitário das populações de peixes (BELO ET AL., 2005).

Agentes etiológicos que causam poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural, podem se tornar agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando os mesmos são submetidos às condições de criação (YOUSEFIAN & AMIRI, 2009). O *Streptococcus agalactiae* é considerado um patógeno oportunista, responsável por enormes perdas econômicas em tilapiculturas intensivas e segundo a Organização Mundial da Saúde, este microrganismo representa a principal causa de meningite bacteriana em crianças, apresentado grande importância para a saúde pública (ASENCIOS ET AL., 2016).

Segundo Reque et al. (2010), as infecções bacterianas são agressões biológicas ao organismo dos peixes que respondem através da reação inflamatória na tentativa de diluir, circunscrever, isolar ou destruir o agente agressor. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, e se caracteriza por vasodilatação arteriolar, capilar e venular; aumento de permeabilidade vascular e instituição de edema; aumento da viscosidade sangüínea e marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes (Moraes & Moraes, 2009). Neste contexto, a histamina é um autacóide, importante mediador dos processos inflamatórios. Suas ações sobre o músculo liso e endotélio vascular, permitem a dilatação ou constrição de determinados vasos sanguíneos, participando de mecanismos de permeabilidade vascular (ARMSTRONG & KVEDAR, 2011).

Partindo-se da importância patogênica da estreptococose para tilapicultura intensiva e da importância da reação inflamatória na resposta de defesa dos peixes teleósteos, este estudo propõe avaliar a participação da histamina na reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo inoculadas com *Streptococcus agalactiae*.

2. JUSTIFICATIVA

Com base na importância da tilapicultura para economia brasileira, associado à necessidade de desenvolvimento técnico sanitário para a criação dos peixes, esta investigação propõe estudar e identificar aspectos importantes envolvidos na fisiopatologia do processo inflamatório agudo em peixes teleósteos, através da administração inóculos vivos e bacterinas de *Streptococcus agalactiae*.

3. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivos avaliar a evolução da reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, através de aerocistite induzida por bacterina ou pela inoculação de *Streptococcus agalactiae* viva.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação do hemograma das tilápias durante a reação inflamatória aguda.
- Determinação da bioquímica sérica das tilápias durante a reação inflamatória aguda.
- Avaliação somática do coração, fígado, baço e rim cranial das tilápias durante a reação inflamatória aguda.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 Tilapicultura no Brasil

A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), nativa de países africanos, é a espécie de tilápia mais cultivada no mundo. Tem rápido crescimento, é de grande

rusticidade, fácil manejo, alto índice de rendimento e possui carne de ótima qualidade (GALLI; TORLONI, 1999). Atinge cerca de 400 a 600 gramas em 6 a 8 meses de cultivo (EMATER, 1999).

Diversas fontes revelaram que a tilápia, no final dos anos 90, se tornou o peixe mais cultivado no Brasil, com crescimento anual superior a 20% em 2004, responsável por 40% do volume total da aquicultura nacional. A piscicultura brasileira ainda é uma atividade característica de pequenas propriedades. Estima-se que cem mil unidades aquícolas brasileiras cultivavam tilápias no ano de 2003, uma indústria com um valor anual superior a US\$ 50 milhões (ZIMMERMANN, 2004).

O Paraná é o estado brasileiro que mais produz tilápias. No entanto no inverno, as baixas temperaturas comprometem a produtividade e colocam em riscos os estoques onerando a produção. Os estados de São Paulo e Santa Catarina vêm logo em seguida e apresentam as mesmas limitações. Por outro lado é imenso o potencial para indústria de tilápias em alguns estados brasileiros, como Alagoas, Sergipe Ceará, Goiás e região norte do Mato Grosso do Sul. Nestas regiões de temperaturas adequadas para a produção e desenvolvimento o ano inteiro, a tilápia pode ser produzida a um baixo custo (KUBITZA, 2000).

5.2 *Streptococcus agalactiae*

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Streptococcus* são bactérias de coloração Gram positiva, catalase negativa, cujas células têm menos de 2 micrometros de diâmetro, apresentando-se morfológicamente como cocos (esféricos ou ovóides) que podem estar agrupados aos pares ou em cadeia (COSTA, 2000).

Dentre as espécies de estreptococos, o *Streptococcus iniae* e o *Streptococcus agalactiae* são considerados os mais importantes patógenos para a aquicultura (SHOEMAKER; KLESIOUS, 1997).

Streptococcus agalactiae tem sido isolado de animais homeotermos terrestres ou heterotermos aquáticos, o que indica uma ampla diversidade de hospedeiros (EVANS et al., 2002A). Além disso, nos últimos anos, tem-se observado uma elevação da ocorrência de casos clínicos associados a *S. agalactiae* em diferentes regiões geográficas, o que levou o mesmo a ser considerado patógeno emergente para peixes em ambientes de água doce ou marinho (EVANS et al., 2002B).

A estreptococose é uma doença septicêmica que afeta peixes de água doce e de água salgada, ambos em criação ou livre no ambiente. As principais espécies

envolvidas são *S. iniae* e *S. galactiae*, com sinais clínicos à infecção e espectro de hospedeiros semelhantes (EVANS et al., 2002; SHELBY et al., 2002).

5.3 Inflamação aguda

A inflamação divide-se em aguda e crônica. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, perdurando por minutos, horas, por um ou dois dias, e se caracteriza por vasodilatação arteriolar, capilar e venular; aumento de permeabilidade vascular e instituição de edema; aumento da viscosidade sangüínea e marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes (GARCIA LEME, 1989; KUMAR, 2004; MORAES e MORAES, 2009). Este quadro pode sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal, da intensidade da agressão e do nível de especificidade da resposta (GARCIA LEME, 1989).

Reação semelhante, mas menos complexa, ocorre em peixes teleósteos, havendo, também, o acúmulo de células no foco lesado e fagocitose por células competentes (COLONNA et al., 2006).

6. MATERIAL E METODOS

Número comitê de ética: 0022/17

6.1 Peixes e acondicionamento

Foram utilizadas 56 tilápias (*Oerochromis niloticus*), jovens, que foram acondicionados em 7 aquários, com capacidade de 100 L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano com vazão de 1 L/min. Após o transporte para os aquários, os peixes foram aclimatados durante uma semana, tempo necessário para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L (CARNEIRO & URBINATI, 2001). Durante o estudo os animais receberam ração comercial. O arraçoamento dos animais foi feito três vezes ao dia com a administração de 2% da biomassa dos aquários.

6.2 Delineamento experimental

O experimento foi realizado na UNESP/FCAV – Jaboticabal, no departamento de preventiva.

Foram avaliados oito animais por tratamento em três períodos, isto é: 6, 24 e 48 horas após a administração de inóculos vivos de *Streptococcus agalactiae* na bexiga natatória. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 7 aquários que constituíram as repetições dos diferentes tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das tilápias (*Oerochromis niloticus*) nos diferentes tratamentos para estudos da inflamação aguda.

Grupos	Tratamentos	HPD (Horas pós-desafio ¹)		
		6	24	48
T 0	Controle	N = 8		
T 1	Inoculação de bacterina	N = 8	n = 8	N = 8
T 2	Inoculação de <i>Streptococcus agalactiae</i>	N = 8	n = 8	N = 8

¹ Estímulo inflamatório na bexiga natatória

6.3 Anestesia dos peixes

Os peixes foram pré-anestesiados na proporção de 10:10.000 e anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para a inoculação da bactéria e 1:500 no momento da eutanásia. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (WEDEMEYER, 1980). Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados em aquário com fluxo de água contínuo e aeração.



Figura 1: (A) Peixes pré-anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína (10:10.000) para a administração da bacterina e de *Streptococcus agalactiae* viva; (B) Peixe (*Oerochromis niloticus*) anestesiado por imersão em solução aquosa de benzocaína (1:500) para eutanásia. (Fonte: próprio autor)

6.4 Indução do processo inflamatório

Com os peixes anestesiados na região anteromediana foi injetado o inóculo de bacterina ou de *Streptococcus agalactiae* vivas, um centímetro à direita do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa de tuberculina esterilizadas, de modo a atingir a bexiga natatória anterior.

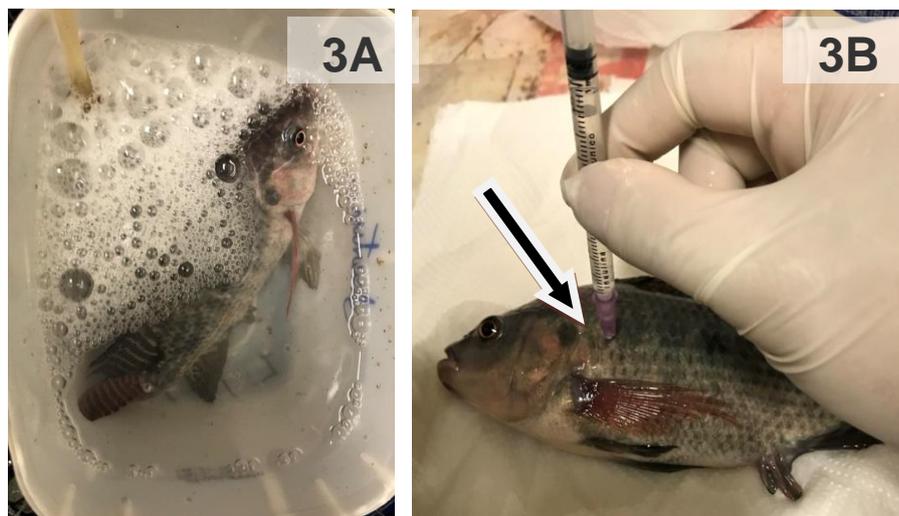


Figura 2: (A) Peixe (*Oerochromis niloticus*) anestesiado por imersão em solução aquosa de benzocaína (1:10.000) para a administração do inóculo de *Streptococcus agalactiae*. (B) Administração do inóculo na bexiga natatória. (Fonte: Próprio autor)

6.5 Isolamento do *Streptococcus agalactiae* e infecção experimental

As cepas de *S. agalactiae* foram mantidas congeladas a -70°C e no momento do uso, uma alíquota do isolado foi descongelada e o material semeado em caldo BHI (Brain Heart Infusion – Difco) em duplicata para incubação a 25°C , durante 48 horas.

Ensaio para estabelecimento da DL50, dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais, foram conduzidos de acordo com a metodologia proposta por Plumb (1999), utilizando as concentrações de 10^5 - 10^9 unidade formadora de colônia (UFC) por peixe, sendo a DL50 estabelecida em $1,0 \times 10^8$ UFC. Com os peixes anestesiados, foi injetado o inoculo de *S. agalactiae* na cavidade celomática.



Figura 3: Fracos contendo bactéria e bacterina de *Streptococcus agalactiae* que vão ser inoculados nos peixes (*Oerochromis niloticus*). (Fonte: Próprio autor)

6.7 Produção da bacterina contra *S. agalactiae*

A suspensão bacteriana utilizada como vacina foi produzida pelo cultivo de alíquota do isolado de *S. agalactiae* em 500 mL de meio líquido de conforme Pilarski et al. (2008), a 28°C , durante 48 horas.

A massa bacteriana foi obtida por centrifugação (4000 rpm, 4°C , por 20 minutos), após três lavagens sucessivas com solução de PBS estéril (pH 7,4) para retirada completa do meio de cultura e então foi ressuspensa em 100 mL de PBS. A concentração da vacina foi ajustada para $1,0 \times 10^9$ células mL^{-1} .

Para inativação adicionou-se 0,5% de formol (volume/volume) à suspensão bacteriana, ficou sob agitação constante a temperatura ambiente. Depois sendo mantida a 4°C , durante 24 horas. À suspensão antigênica foi adicionado o adjuvante

incompleto de Freund (na proporção de 1:1) e essa mistura foi emulsionada em misturador elétrico e mantida sobre refrigeração até o momento do uso.

6.8 Avaliação do eritrograma, contagem total e diferencial de leucócitos.

Foram colhidas amostras de sangue dos peixes 6, 24 e 48 horas após a administração do incóculo. Para a determinação do eritrograma foi utilizado contador automático de células sanguíneas (Modelo CC510, da Celm). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald-Giensa-Wright (BELO et al., 2014). Para a contagem de leucócitos e trombócitos totais foram contados 10 campos de cada extensão, quantificando o número de eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Os valores de leucócitos e trombócitos totais foram determinados mediante os seguintes cálculos:

$$\text{Leucócitos Totais } (\mu\text{L}) = \frac{\text{número de leucócitos X contagem de eritrócitos } (\mu\text{L})}{\text{Número de eritrócitos na extensão sanguínea}}$$

$$\text{Trombócitos Totais } (\mu\text{L}) = \frac{\text{número de trombócitos X contagem de eritrócitos } (\mu\text{L})}{\text{Número de eritrócitos na extensão sanguínea}}$$

6.9 Avaliação hematológica

Foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal. A determinação da contagem global de células vermelhas e brancas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando a solução de Natt e Herrick (1952) com diluente na proporção de 1:100. Foram realizadas a determinação do percentual de hematócrito em microcentrífuga e da quantidade de hemoglobina circulante com reagente de Drabkin's para leitura em comprimento de onda de 540nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) serão obtidos pelo cálculo $\text{VCM} = (\text{HT}/\text{HE}) * 100$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $\text{CHCM} = (\text{HG}/\text{HT}) * 100$. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas com a contagem de 100 células, estabelecendo o percentual de cada

tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald-Giensa-Wright (BELO et al., 2013).

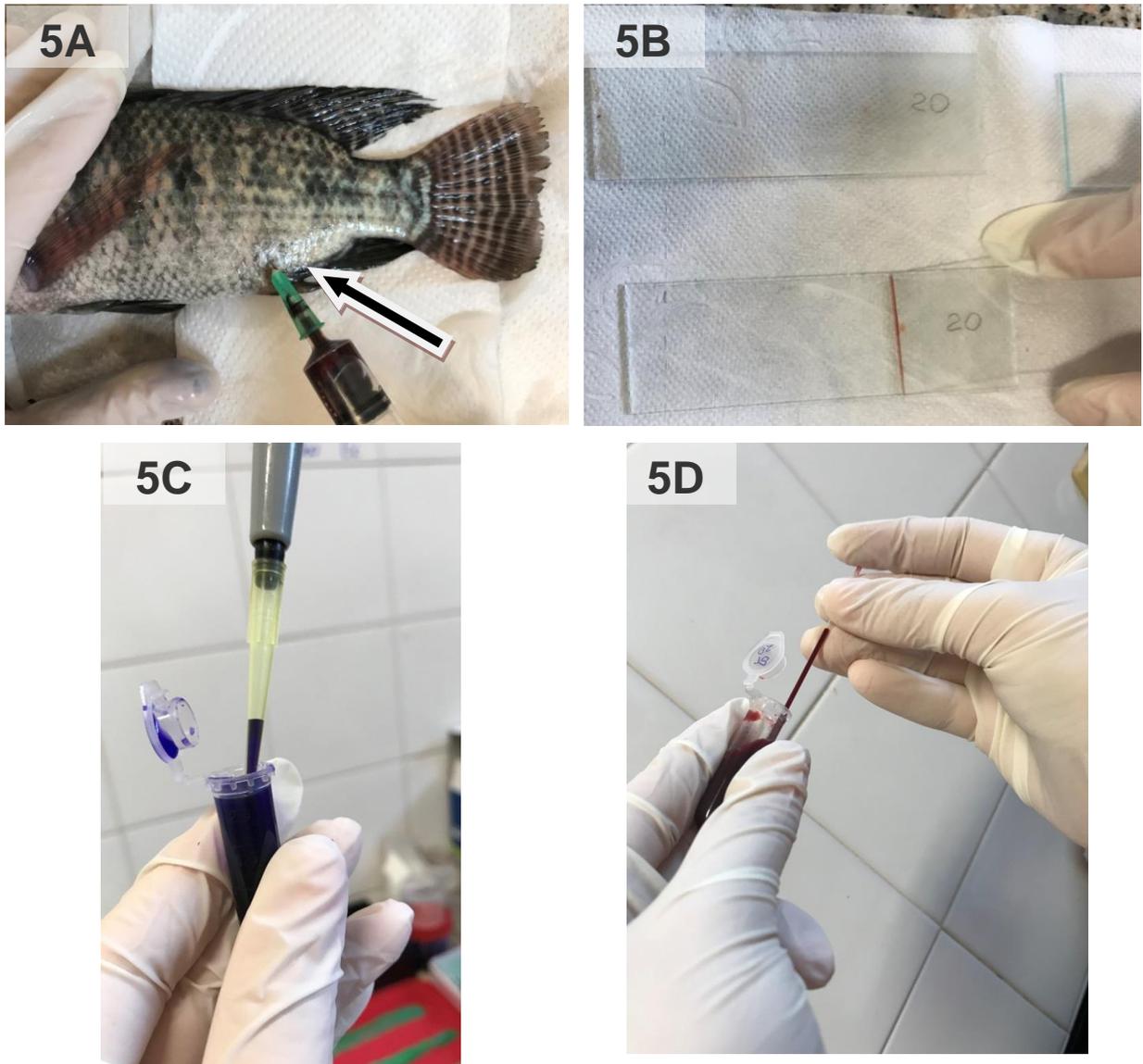


Figura 4: (A) Coleta de sangue do vaso caudal para realização das análises; (B) Extensão sanguínea para a contagem diferencial de leucócitos; (C) Colocando o sangue na solução de Natt e Herrick com diluente na proporção de 1:100, para contagem global de células vermelhas e brancas foram realizadas em câmara de Neubauer; (D) Realização do capilar para determinar o percentual de hematócrito.

6.10 Monitoramento da qualidade da água e sinais clínicos

O monitoramento da qualidade da água foi realizado diariamente às 8:00 e 17:00 horas, avaliando-se o potencial hidrogeniônico, condutividade elétrica, concentração de oxigênio, além da temperatura da água através de peagâmetro e oxímetro portátil “YSI – 63” e “YSI- 55”, respectivamente.

Diariamente, os animais foram examinados quanto ao eventual aparecimento de alterações de comportamento e fisiológicas entre os diferentes tratamentos.

6.11 Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo esquema fatorial 2 X 3 (2 tratamentos → bacterina e bactéria viva e 3 tempos diferentes → 6, 24 e 48 horas), “ Split Plot Design”, utilizando procedimento GLM (General Linear Model) do programa SAS, versão 9.3 (Statistical Analysis Software, 2012).

A análise de variância das médias foi determinado pelo teste de T ($p < 0,05$).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados no estudo comparativo entre a reação inflamatória aguda induzida por bacterina ou infecção aguda por *Streptococcus agalactiae* estão apresentados nas Tabelas 2 a 6. O estudo leucocitário demonstrou leucocitopenia e trombocitopenia de peixes submetidos a ambos os estímulos inflamatórios quando comparados aos valores de referência de animais controles (Tabela 2). Entretanto, não se observou alterações significativas ($p > 0,05$) entre os peixes estimulados com bacterina ou inóculo vivo de *S. agalactiae*. Uma hipótese que justifica estes achados é o fato de grande quantidade de leucócitos estarem migrando para o foco inflamado na bexiga natatória. Reque et al. (2010) e Castro et al. (2014) verificaram significativo aumento de células inflamatórias em exsudato de tilápias durante aerocistite por bacterinas de *Aeromonas hydrophila*. A cinética de migração de células do compartimento sanguíneo para o foco inflamado foi observado em tilápias durante aerocistite infecciosa por inoculação de *A. hydrophila* vivas na bexiga natatória de tilápias (MORAES et al., 2018). Claudiano et al. 2013 observou efeito semelhante em pacus, *Piaractus mesopotamicus*, submetidos ao mesmo protocolo experimental com inflamação induzida por bacterina de *A. hydrophila*.

O estudo diferencial de leucócitos revelou neutropenia e linfocitopenia absoluta em peixes submetidos a ambos os estímulos inflamatórios e monocitose relativa quando comparados aos animais controles (Tabela 2 e 3, respectivamente). A intensa migração de neutrófilos e linfócitos para o foco inflamatório na fase inicial da inflamação justificam estes achados, enquanto, os monócitos migram em fase mais tardia. Semelhantemente ao observado em mamíferos, o estudo celular no

exsudato de tilápias submetidas ao estímulo inflamatório por *A. hydrophila* vivas na bexiga natatória de tilápias revelou que o principal grupo celular presente na fase aguda são os granulócitos, acompanhado por linfócitos e trombócitos (MORAES et al., 2018), corroborando os achados deste estudo.

Tabela 2. Valores médios¹ (\pm SE) e ANOVA² das contagens total e diferencial de leucócitos observados em tilápias (*Oerochromis niloticus*) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.

Período	Tratamentos	Leucócitos Totais (μ L)	Trombócitos Totais (μ L)	Neutrófilos (μ L)	Linfócitos (μ L)	Monócitos (μ L)
	Padrão Fisiológico	99105 \pm 11366	66753 \pm 7403	25966 \pm 3021	69507 \pm 8426	3632 \pm 523
6 HORAS	Bacterina	53750 \pm 5387 Aa	41393 \pm 3854 Aa	12903 \pm 1234 Aa	36986 \pm 4202 Aa	3861 \pm 442 Aa
	Bactéria	38529 \pm 5431 Aa	29614 \pm 4281 Aa	10468 \pm 1169 Aa	24175 \pm 3892 Ba	3886 \pm 625 Aa
24 HORAS	Bacterina	49905 \pm 7484 Aa	36810 \pm 5349 Aa	11862 \pm 1697 Aa	33647 \pm 5461 Aa	4396 \pm 464 Aa
	Bactéria	33531 \pm 5568 Aa	21755 \pm 3399 Aa	6409 \pm 906 Ba	23818 \pm 4305 Aa	3304 \pm 507 Aa
48 HORAS	Bacterina	45249 \pm 9059 Aa	34350 \pm 7729 Aa	9003 \pm 1715 Aa	32321 \pm 6713 Aa	3925 \pm 779 Aa
	Bactéria	34757 \pm 3183 Aa	26910 \pm 3004 Aa	7096 \pm 867 Aa	24112 \pm 2014 Aa	3549 \pm 405 Aa
Tratamento		4.02 ^{NS}	3.91 ^{NS}	4.40*	4.00*	0.62 ^{NS}
Tempo		0.27 ^{NS}	0.46 ^{NS}	1.92 ^{NS}	0.08 ^{NS}	0.02 ^{NS}
Tratamento X Tempo		0.06 ^{NS}	0.14 ^{NS}	0.52 ^{NS}	0.07 ^{NS}	0.31 ^{NS}
C.V. ⁶		50.74	56.25	49.59	54.62	49.63

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05)

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental,

letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Padrão Fisiológico (n=8) - Peixes mantidos nas mesmas condições experimentais de ambiência e alimentação, porém sem nenhum tipo de estímulo.

⁴ NS - Não significativo; *significativo para P<0,05; **Significativo para P<0,01.

⁵ CV - Coeficiente de Variação (%);

Na comparação entre os diferentes estímulos inflamatórios, tilápias submetidas ao estímulo infeccioso por *S. agalactiae* apresentaram diminuição significativa (p<0,05) do número de linfócitos 6 HPI e neutrófilos 24 HPI quando comparados aos peixes estimulados com bacterina (Tabela 2). Tais achados sugerem uma intensidade maior de migração de neutrófilos e linfócitos para o foco inflamado, corroborando os resultados observados nas tilápias estimuladas com inóculo vivo de *A. hydrophila* (MORAES et al., 2018). A monocitose relativa observada em peixes submetidos ao estímulo inflamatório na Tabela 3 pode ser

resultante da diminuição do número de linfócitos e neutrófilos, pois na contagem proporcional estabelecida na extensão sanguínea o menor número destes dois grupos de leucócitos resulta num aumento proporcional na contagem de monócitos. Por outro lado, monocitoses são observadas em evoluções inflamatórias crônicas (BELO et al., 2014), pois estas células sofrem diferenciação em macrófagos após o processo de diapedese, constituindo um importante grupo celular em fase tardia (BELO et al., 2012a; 2014).

Tabela 3. Valores médios¹ (\pm SE) e ANOVA² das contagens relativas (percentuais) de leucócitos observados em tilápias (*Oerochromis niloticus*) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.

Período	Tratamentos	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)
	Padrão Fisiológico ³	26.43 \pm 1.59	69.71 \pm 1.53	3.71 \pm 0.53
6 HORAS	Bacterina	24.29 \pm 1.64 ^{Aa}	67.86 \pm 2.21 ^{Aa}	7.86 \pm 1.13 ^{Aa}
	Bactéria	29.00 \pm 1.52 ^{Aa}	60.86 \pm 1.99 ^{Bb}	10.14 \pm 0.60 ^{Aa}
24 HORAS	Bacterina	24.00 \pm 1.87 ^{Aa}	66.43 \pm 0.83 ^{Aa}	9.57 \pm 0.62 ^{Aa}
	Bactéria	21.00 \pm 1.84 ^{Ab}	68.86 \pm 1.67 ^{Aa}	10.14 \pm 0.83 ^{Aa}
48 HORAS	Bacterina	21.00 \pm 1.08 ^{Aa}	70.86 \pm 1.45 ^{Aa}	8.14 \pm 0.49 ^{Aa}
	Bactéria	20.17 \pm 1.18 ^{Ab}	69.83 \pm 0.82 ^{Aa}	10.00 \pm 0.63 ^{Aa}
Tratamento ⁴		0.04 ^{NS}	1.33 ^{NS}	3.54 ^{NS}
Tempo ⁴		6.12 ^{**}	4.52 ^{**}	0.44 ^{NS}
Tratamento X Tempo ⁴		2.59 ^{NS}	2.97 ^{NS}	0.39 ^{NS}
C.V. ⁵		19.80	7.68	28.71

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05)

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental,

letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Padrão Fisiológico (n=8) - Peixes mantidos nas mesmas condições experimentais de ambiência e alimentação, porém sem nenhum tipo de estímulo.

⁴ NS - Não significativo; *significativo para P<0,05; **Significativo para P<0,01.

⁵ CV - Coeficiente de Variação (%);

O estudo da série vermelha revelou diminuição do número de eritrócitos, associado ao aumento de hemoglobina, VCM e CHCM em tilápias submetidas a

ambos os estímulos inflamatórios quando comparados aos peixes do grupo controle (Tabela 4). O aumento no tamanho das hemácias pode ser resultante de alterações do equilíbrio líquido-eletrolítico, pois o estímulo inflamatório representou um estresse aos animais. Em condições de estresse ocorre aumento da liberação de cortisol (BELO et al., 2005). Este esteróide em peixes teleósteos exerce atividade glicocorticoide e mineralocorticoide, diferentemente de mamíferos em que grande parte da atividade mineralocorticoide é exercida pelo hormônio aldosterona (BELO et al., 2012a; 2014). O desequilíbrio líquido-eletrolítico pode favorecer o influxo de líquido para dentro das células, resultando em aumento do VCM, como observado nas tilápias durante a evolução da reação inflamatória.

Tabela 4. Valores médios¹ (\pm SE) e ANOVA² observados no estudo eritrocitário das tilápias (*Oerochromis niloticus*) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.

Período	Tratamentos	Eritrócitos Totais (μ L)	Hematócrito (%)	VCM ⁶ (fL)	Hemoglobina (g/dL)	CHCM ⁶ (g/dL)
	Padrão Fisiológico ³	2.30 \pm 0.16	25.71 \pm 1.96	117.83 \pm 13.42	4.90 \pm 0.31	19.39 \pm 0.66
6 HORAS	Bacterina	2.06 \pm 0.12 Aa	25.86 \pm 1.70 Aa	125.42 \pm 2.62 Ab	6.14 \pm 0.44 Aa	23.66 \pm 0.58 Aa
	Bactéria	1.93 \pm 0.08 Aa	24.29 \pm 1.02 Aa	126.63 \pm 4.33 Aa	5.49 \pm 0.21 Aa	22.65 \pm 0.46 Aa
24 HORAS	Bacterina	1.96 \pm 0.16 Aa	26.67 \pm 1.01 Aa	142.91 \pm 8.09 Aab	4.34 \pm 0.26 Ab	17.24 \pm 0.39 Bb
	Bactéria	2.13 \pm 0.11 Aa	24.00 \pm 2.16 Aa	113.51 \pm 9.38 Ba	5.01 \pm 0.30 Aa	21.43 \pm 0.79 Aa
48 HORAS	Bacterina	1.97 \pm 0.07 Aa	27.17 \pm 2.44 Aa	156.75 \pm 11.83 Aa	5.97 \pm 0.28 Aa	22.57 \pm 1.29 Aa
	Bactéria	1.88 \pm 0.06 Aa	24.33 \pm 0.76 Aa	131.01 \pm 6.44 Aa	5.27 \pm 0.11 Aa	21.89 \pm 0.88 Aa
	Tratamento ⁴	0.02 ^{NS}	1.66 ^{NS}	4.48*	0.51 ^{NS}	1.22 ^{NS}
	Tempo ⁴	0.30 ^{NS}	0.05 ^{NS}	1.65 ^{NS}	4.84**	7.73**
	Tratamento X Tempo ⁴	0.64 ^{NS}	0.05 ^{NS}	1.40 ^{NS}	1.98 ^{NS}	3.76*
	C.V. ⁵	18.84	22.49	19.79	19.16	11.85

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05)

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental,

letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Padrão Fisiológico (n=8) - Peixes mantidos nas mesmas condições experimentais de ambiência e alimentação, porém sem nenhum tipo de estímulo.

⁴ NS - Não significativo; *significativo para P<0,05; **Significativo para P<0,01.

⁵ CV - Coeficiente de Variação (%);

⁶ VCM: volume corpuscular médio; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

O aumento de hemoglobina e CHCM em tilápias submetidas a ambos os estímulos inflamatórios pode ser resultante da contração esplênica, reforçando a hipótese da ocorrência de estresse nas tilápias. A ativação do eixo-hipotalâmico-adrenérgico durante o estresse estimula à liberação de catecolaminas pelas células cromafins (TORT, 2011). Estas aminas biogênicas atuam em receptores

adrenérgicos predominantemente do tipo alfa-1 na cápsula esplênica, resultando em contração do baço e liberação de hemácias para a circulação sistêmica (VANDELAAR-BONGA, 1997). Este aumento do número de eritrócitos na circulação justificaria o aumento de hemoglobina e CHCM observado nas tilápias. O estudo somático esplênico confirma a diminuição do tamanho do baço de peixes submetidos ao estímulo inflamatório em relação aos peixes controles (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios¹ (\pm SE) e ANOVA² observados no estudo somático de coração, fígado, baço e rim cranial das tilápias (*Oerochromis niloticus*) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.

Período	Tratamentos	ICS ⁶	IHS ⁶	IES ⁶	INS ⁶
Padrão Fisiológico ³		0.12 \pm 0.01	2205.14 \pm 162.72	0.18 \pm 0.03	0.26 \pm 0.01
6 HORAS	Bacterina	0.15 \pm 0.01 ^{Aa}	2236.20 \pm 52.33 ^{Aa}	0.11 \pm 0.01 ^{Aa}	0.30 \pm 0.02 ^{Aa}
	Bactéria	0.12 \pm 0.01 ^{Aa}	2191.67 \pm 235.31 ^{Aa}	0.13 \pm 0.02 ^{Aa}	0.26 \pm 0.02 ^{Aa}
24 HORAS	Bacterina	0.13 \pm 0.01 ^{Aa}	2242.25 \pm 113.54 ^{Aa}	0.17 \pm 0.02 ^{Aa}	0.27 \pm 0.02 ^{Aa}
	Bactéria	0.14 \pm 0.02 ^{Aa}	2602.00 \pm 226.26 ^{Aa}	0.13 \pm 0.02 ^{Aa}	0.25 \pm 0.02 ^{Aa}
48 HORAS	Bacterina	0.13 \pm 0.01 ^{Aa}	2185.60 \pm 123.30 ^{Aa}	0.16 \pm 0.02 ^{Aa}	0.18 \pm 0.01 ^{Ab}
	Bactéria	0.12 \pm 0.01 ^{Aa}	2721.00 \pm 107.58 ^{Aa}	0.14 \pm 0.02 ^{Aa}	0.23 \pm 0.01 ^{Aa}
Tratamento ⁴		0.29 ^{Ns}	1.76 ^{Ns}	0.17 ^{Ns}	0.06 ^{Ns}
Tempo ⁴		0.30 ^{Ns}	0.52 ^{Ns}	0.86 ^{Ns}	4.44 [*]
Tratamento X Tempo ⁴		0.69 ^{Ns}	0.67 ^{Ns}	0.98 ^{Ns}	1.76 ^{Ns}
C.V. ⁵		31.08	24.47	44.52	24.03

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T (P<0,05)

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Padrão Fisiológico (n=8) - Peixes mantidos nas mesmas condições experimentais de ambiência e alimentação, porém sem nenhum tipo de estímulo.

⁴ NS - Não significativo; *significativo para P<0,05; **Significativo para P<0,01.

⁵ CV - Coeficiente de Variação (%);

⁶ ICS: índice cardiossomático; IHS: índice hepatossomático; IES: índice esplênossomático; INS: índice nefrossomático (apenas rim cranial).

De acordo com Belo et al. (2012b), o estudo somático pode auxiliar na investigação de alterações patológicas como edema, congestão, entre outros, os quais resultariam em aumento proporcional do tamanho dos órgãos. Entretanto, não se observou variações significativas nos índices somáticos hepáticos, cardíacos e

renais das tilápias submetidas a ambos os estímulos inflamatórios quando comparadas aos animais do grupo controle (Tabela 5).

O estudo bioquímico sérico das tilápias revelou aumento dos níveis circulantes de proteínas e glicose em peixes submetidos a ambos os estímulos inflamatórios (Tabela 6). O aumento de proteínas é justificado pelo incremento de proteínas de fase aguda resultantes do estímulo inflamatório (CHARLIE-SILVA, 2017), porém não se observou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre peixes inoculados com bacterina ou com *S. agalactiae* viva (Tabela 6). Enquanto, o aumento da glicemia pode ser resultante da atividade glicocorticoide do cortisol durante o estímulo inflamatório (BELO et al. 2005), corroborando os achados hematológicos e somáticos, sendo este aumento mais significativo ($p < 0,05$) em peixes inoculados com a *S. agalactiae* viva (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios¹ (\pm SE) e ANOVA² observados no estudo bioquímico sérico de proteínas e glicose das tilápias (*Oerochromis niloticus*) submetidas a diferentes estímulos inflamatórios.

Período	Tratamentos	Proteína Total (g/dL)	Glicemia (mg/dL)
Padrão Fisiológico ³		3.15 \pm 0.12	47.71 \pm 9.08
6 HORAS	Bacterina	3.34 \pm 0.16 ^{Aa}	58.14 \pm 6.25 ^{Aa}
	Bactéria	3.25 \pm 0.10 ^{Aa}	58.71 \pm 7.05 ^{Aa}
24 HORAS	Bacterina	3.18 \pm 0.07 ^{Aa}	64.85 \pm 6.32 ^{Aa}
	Bactéria	3.20 \pm 0.16 ^{Aa}	61.85 \pm 5.91 ^{Aa}
48 HORAS	Bacterina	3.40 \pm 0.09 ^{Aa}	48.66 \pm 3.24 ^{Ba}
	Bactéria	3.31 \pm 0.05 ^{Aa}	80.00 \pm 10.7 ^{Aa}
Tratamento ⁴		0.02 ^{NS}	1.60 ^{NS}
Tempo ⁴		0.82 ^{NS}	0.23 ^{NS}
Tratamento X Tempo ⁴		0.22 ^{NS}	1.95 ^{NS}
C.V. ⁵		13.75	38.80

¹ Médias (n=8) seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste T ($P < 0,05$)

² Análise de variância estatística representada por letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento nos diferentes dias experimentais.

³ Padrão Fisiológico (n=8) - Peixes mantidos nas mesmas condições experimentais de ambiência e alimentação, porém sem nenhum tipo de estímulo.

⁴ NS - Não significativo; *significativo para $P < 0,05$; **Significativo para $P < 0,01$.

⁵ CV - Coeficiente de Variação (%);

8. CONCLUSÃO

O estudo da reação inflamatória aguda em tilápias do Nilo, *Oerochromis niloticus*, em aerocistite induzida por bacterina ou pela inoculação de *S. agalactiae* vivos revelou trombocitopenia e leucopenia com marcada linfopenia e neutropenia, sendo estes achados mais significativos em peixes inoculados com a bactéria viva. A reação inflamatória resultou em aumento de hemoglobina, VCM e CHCM, associado ao aumento sérico de proteínas, glicose e diminuição somática esplênica, demonstrando o estresse que representou o estímulo inflamatório aos peixes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASENCIOS, Y.O.; SÁNCHEZ, F.B.; MENDIZÁBAL, H.B.; PUSARI, K.H.; ALFONSO, H.O.; SAYÁN, A.M.; PEREIRA FIGUEIREDO, M.A.P.; MANRIQUE, W.G.; BELO, M.A.A ; CHAUPE, N.S. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. *Aquaculture Reports*, v. 4, p. 74- 79, 2016.

BELO, M.A.A., SOUZA, D.G.F., FARIA, V.P., PRADO, E.J.R., MORAES, F.R., ONAKA, E.M. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. *Journal of Fish Biology* v.82, p.1403-1410, 2013.

BELO, M.A.A.; SOARES, V.E. ; SOUZA, L.M. ; SOBREIRA, M.F.R. ; CASSOL, D.M.S. ; TOMA, S.B. . Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology (Print)*, v. 64, p. 155-165, 2012b.

BELO, M.A.A., SCHALCH, S.H.C., MORAES, F.R., SOARES, V.E., OTOBONI, A., MORAES, J.E.R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Comparative Pathology*, v.133, p.146-154, 2005.

BELO, M.A.A.; MORAES, F.R.; YOSHIDA, L.; PRADO, E.J.R.; MORAES, J.R.E.; SOARES, V.E.; SILVA, M.G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. *Aquaculture*, v.422-423, p.124-128, 2014.

BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E.; SOARES, V.E.; MARTINS, M.L.; BRUM, C.D.; MORAES, F.R. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, p. 1015-1021, 2012a.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. *Aquaculture Research*, v.32, p. 298-304, 2001

CASTRO, M.P.; CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; SHIMADA, M.T.; BELO, M.A.A.; MACHADO, C.M.M.; MORAES, J.R.E.; MANRIQUE, W.G., MORAES, F.R. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbocholate and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.31, p.284-290, 2014.

CASTRO, M.P.; CLAUDIANO, G.S. ; BORTOLUZZI, N.L. ; GARRIDO, E.; FUJIMOTO, R.Y. ; BELO, M.A.A. ; SHIMADA, M.T.; MORAES, J.E.R.; MORAES, F.R. Chromium carbocholate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture (Amsterdam)*, p. 114-118, 2014.

CASTRO, M.P.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; CRUZ, C.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E. Acute Toxicity by Water Containing Hexavalent or Trivalent Chromium in Native Brazilian Fish, *Piaractus mesopotamicus*: Anatomopathological Alterations and Mortality. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 92, p. 213-219, 2013

CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; CASTRO, M.P.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSO, P.F.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E. ; MORAES, F.R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines.. *Fish & Shellfish Immunology (Print)*, v. 34, p. 1057-1062, 2013.

COLONNA, M., PULENDRAN, B., IWASAKI, A. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nature Immunology*, v.7(2), p.117-120, 2006.

CONTRAN; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 4ª. Elsevier., 49pp. 2004.

COSTA, M. (2000); *Streptococcus e outros Cocos Gram positivos Associados*. In: FERREIRA, W.C. & SOUSA, J.C.F.; *Microbiologia Volume 2*; Lidel; pp. 51-62

BELO, M.A.A.; MORAES, F.R.; YOSHIDA, L.; PRADO, E.J.R. ; DE MORAES, J.R.E.; SOARES, V.E.; SILVA, M.G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. *Aquaculture (Amsterdam)*, v. 422-23, p. 124-128, 2014.

EMATER, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do DF, vinculada á Secretaria de Agricultura. Levantamento sobre a situação da piscicultura no estado do Paraná, 2003.

ETO, S.F. ; FERNANDES, D.C. ; MORAES, A.C. ; PRADO, E.J.R. ; BALDASSI, A.C.; MANRIQUE, W.G. ; SILVA, I.C. ; MEDEIROS, A.S.R. ; BELO, M.A.A. ; BALBUENA, T.S. ; SAMARA, S.I. ; PIZAURO, J.M. Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* -caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY*, v. 76, p. 153-160, 2018.

EVANS, J.J.; KLESIUS, P.H.; GILBERT, P.M et al Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *J. Fish Dis.*, v.25, p.505-513, 2002a.

EVANS, J.J.; WIEDENMAYER, A.A.; KLESIUS, P.H. A transport system for maintenance of viability of *Acinetobacter calcoaceticus*, *Streptococcus iniae*, and *Streptococcus agalactiae* over varying time periods. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, v.22, p. 238- 246, 2002b.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). FAO atualiza os dados da pesca e aquicultura mundial. <http://www.aquaculturebrasil.com/2018/07/09/fao-atualiza-dados-da-pesca-e-aquicultura-mundial/>. Acessado em 27/11/2018.

GALLI, L.F.; TORLONI, C.E..C. Criação de Peixes. São Paulo: Livraria Nobel. S. A., 1999.

GARCIA LEME, J. Hormones and Inflammation, p.1-238, CRC Press, Boca Raton, 1989.

KUBITZA, F. Tilápia – Tecnologia e Planejamento na Produção Comercial. Jundiaí, 2000.

MANRIQUE, W.G. ; CLAUDIANO, G.S. ; CASTRO, M.P.; PETRILLO, T.R. ; FIGUEIREDO, M.A.P. ; BELO, M.A.A. ; BERDEAL, M.I.Q. ; MORAES, J.R.E. ; MORAES, F.R. . Expression of Cellular Components in Granulomatous Inflammatory Response in *Piaractus mesopotamicus* Model. Plos One, v. 10, p. e0121625, 2015.

MANRIQUE, W.G. ; CLAUDIANO, G.S. ; PETRILLO, T.R. ; CASTRO, M.P. ; FIGUEIREDO, M.A.P. ; BELO, M.A.A. ; MORAES, J.R.E. ; MORAES, F.R. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* to inflammatory stimuli by BCG and foreign body. Journal of Applied Ichthyology, v. 30, p. 1001-1006, 2014.

MORAES, A.C. ; PRADO, E.J.R. ; FOZ, E.P. ; BARBUIO, R. ; FARIA, V.P. ; BELO, M.A.A. Esteatose hepática altera acúmulo celular em tilápias do Nilo durante aerocistite infecciosa. PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA, v. 38, p. 1570-1576, 2018.

MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E. Nutraceuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). Manejo e sanidade de peixes em cultivos. Macapá: Embrapa Amapá, p.625-723, 2009.

ORTEGA, Y.A ; BARREIRO, F.S; CASTRO, G.S ; HUANCARÉ, K.P; MANCHEGO, A.S; BELO, M.A.A ; FIGUEIREDO, M.A. ; MANRIQUE, W.G ; SANDOVAL, N.C.H. Estreptococos beta-hemolítico en tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en Sullana, Piura - Perú. Revista MVZ Cordoba, v. 22, p. 5653, 2017.

PETRILLO, T.R. ; CLAUDIANO, G.S. ; AGUINAGA, J.Y. ; MANRIQUE, W.G.; CASTRO, M.P. ; BELO, M.A.A. ; MORAES, J.R.E. ; MORAES, F.R. Influence of dexamethasone and levamisole on macrophage recruitment, giant cell formation and blood parameters in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus*. Bioscience Journal (UFU), v. 33, p. 1015-1027, 2017.

REQUE, V.R., MORAES, J.E.R., BELO, M.A.A., MORAES, F.R. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapias fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture*, v.300, p.37-42, 2010.

SAKABE, R.; MORAES, F.R.; BELO, M.A.A.N.; PILARSKI, F.; MORAES, J.R.E. Kinetics of chronic inflammation in Nile tilapia fed n-3 and n-6 essential fatty acids. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (1977. Impressa), v. 48, p. 313-319, 2013.

SHELBY, R.A.; KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A.; EVANS, J.J. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera. *Journal of Fish Disease*, Oxford, v. 25, p. 1-6, 2002.

SHOEMAKER, C.; KLESIUS, P. Streptococcal disease problems and control: a review. *Tilapia Aquaculture*, [S.l.], v. 2, p. 671-680, 1997.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal Fisheries Research Board of Canada*. v.22, n.5, 1980.

YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M. S. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African Journal of Biotechnology, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Amsterdam, v. 8, n. 25, p. 7313-7318, 2009.

ZIMMERMANN, S. Oportunidades na aquicultura: piscicultura. *Food Ingredientes Catálogo Oficial*. São Paulo, 2004.