

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/08/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Infecção experimental de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por *Aeromonas hydrophila*: avaliação de antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro

Sílvia Umeda Gallani

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

Infecção experimental de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por *Aeromonas hydrophila*: avaliação de antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro

Sílvia Umeda Gallani

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Co-Orientador: Dr. Geert F. Wiegertjes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

JABOTICABAL – SÃO PAULO

2019

G163i Gallani, Sílvia Umeda
Infecção experimental de tambaqui (*Colossoma macropomum*)
por *Aeromonas hydrophila* : avaliação de antimicrobianos e da
resposta imune do hospedeiro / Sílvia Umeda Gallani. --
Jaboticabal, 2019
xiii, 141 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2018

Orientadora: Fabiana Pilarski

Coorientador: Geert Wiegertjes

Banca examinadora: Diogo Teruo Hashimoto, Geovana Dotta
Tamashiro, Luiz Carlos Kreutz, Antonio Augusto Mendes Maia
Bibliografia

1. Aquicultura. 2. Bacteriose. 3. Imunidade inata. 4. Peixe. 5.
Peixe nativo. 6. Septicemia hemorrágica I. Título. II. Jaboticabal-
Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Infecção experimental de tambaqui (*Colossoma macropomum*) por *Aeromonas hydrophila*:
avaliação de antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro

AUTORA: SÍLVIA UMEDA GALLANI

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AQUICULTURA,
pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura - CAUNESP

Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO

CAUNESP / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Pós-Doutoranda GEOVANA DOTTÁ TAMASHIRO

/ Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP

Prof. Dr. LUIZ CARLOS KREUTZ

Hospital Veterinário / Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS

Prof. Dr. ANTONIO AUGUSTO MENDES MAIA

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP

Jaboticabal, 18 de fevereiro de 2019.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	IX
Resumo.....	XI
Abstract.....	XIII
Capítulo 1 – Revisão bibliográfica.....	14
1.1. Aquicultura: cenário atual e tendências para a produção de tambaqui.....	14
1.2. Principais enfermidades de peixes de produção no Brasil: destaque para o tambaqui.....	16
1.3. <i>Aeromonas hydrophila</i> : etiologia, sinais clínicos, diagnóstico e tratamento.....	17
1.4. Sistema imune inato dos peixes: principais células e moléculas envolvidas no reconhecimento e destruição do patógeno.....	19
1.4.1. Barreiras físicas e químicas.....	21
1.4.2. Barreira celular.....	21
1.4.3. Barreira humoral.....	24
1.5. Genes imunes.....	29
1.6. Etosis: uma nova via de morte celular do mecanismo imune inato.....	31
2. Objetivo.....	35
2.1. Geral.....	35
2.2. Específico.....	35
3. Referências.....	36
3.1. Capítulo 2- Aeromonosis in tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> : pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture.....	51
Abstract.....	52
1. Introduction.....	53
2. Material and methods.....	54

2.1. Isolation and identification of <i>Aeromonas hydrophila</i> strain from tambaqui.....	54
2.2. Lethal dose (LD) study and Koch’s Postulate: clinical signs, behaviour changes and mortality.....	55
2.2.1. Fish and experimental conditions.....	55
2.2.2. Strain and challenge design.....	56
2.3. Treatment and disinfection of <i>Aeromonas hydrophila</i> : research for antibiotics, disinfectants and herbal medicines.....	57
2.3.1. Agar disk-diffusion susceptibility test.....	57
2.3.2. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC).....	58
3. Results.....	59
3.1. Isolation and identification of <i>Aeromonas hydrophila</i> strain from tambaqui.....	59
3.2. LD ₅₀ for analysis of clinical signs, behaviour changes and mortality.....	60
3.3. Treatment and disinfection of <i>Aeromonas hydrophila</i> : research for antibiotics, disinfectants and herbal medicines.....	63
3.3.1. Agar disk-diffusion susceptibility test.....	63
3.3.2. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC).....	64
4. Discussion.....	66
5. Acknowledgements.....	70
6. References.....	70
Capítulo 3- ETosis in tambaqui infected with <i>Aeromonas hydrophila</i> : a new cell death pathway of the innate immune mechanism and approach of leukocytes immune response.....	76
Abstract.....	78
1. Introduction.....	79
2. Material and methods.....	80

2.1. <i>In vivo</i> study: blood parameters changes in tambaqui infected with <i>Aeromonas hydrophila</i>	80
2.1.1. Fish and experimental conditions.....	80
2.1.2. <i>Aeromonas hydrophila</i> : cultivation and experimental infection.....	81
2.1.3. Blood and serum analysis during different phases of infection.....	82
2.2. ETosis assessment: adapted in vitro protocol for analysis by differential interference contrast (DIC) microscopy and scanning electron microscopy (SEM).....	83
2.2.1. Materials to prepare before starting the procedure.....	83
2.2.2. Leukocytes isolation from head kidney.....	85
2.2.3. Co-incubation: cultivating leukocytes with <i>Aeromonas hydrophila</i> ...	86
2.2.4. SEM processing.....	87
2.3. Statistical analysis.....	88
3. Results.....	89
3.1. Blood and serum analysis during different phases of infection.....	89
3.2. ETosis assessment: adapted in vitro protocol for analysis by differential interference contrast (DIC) microscopy and scanning electron microscopy (SEM).....	94
4. Discussion.....	96
5. Conclusion.....	99
6. Acknowledgements.....	99
7. References.....	99
Capítulo 4 – Patterns of immune response of tambaqui <i>Colossoma macropomum</i> : modulation of gene expression in hemorrhagic septicemia.....	105
Abstract.....	107
1. Introduction.....	108
2. Material and methods.....	109

2.1. Fish, experimental conditions and sampling.....	109
2.2. Experimental disease.....	110
2.3. Primers design.....	111
2.4. RNA extraction for relative qPCR.....	115
2.5. Real time PCR (qPCR): relative quantification of immune genes.....	115
2.6. Complementary study: serum complement system analysis.....	116
2.7. Data statistics and analysis.....	116
3. Results.....	117
3.1. Gene sequences of tambaqui.....	117
3.2. Real time PCR (qPCR): relative quantification of immune genes.....	123
3.2.1. Spleen.....	123
3.2.2. Head kidney.....	124
3.3. Complement system analysis.....	126
4. Discussion.....	126
5. Conclusion.....	132
6. References.....	133
Capítulo 5- Considerações finais.....	140

AGRADECIMENTOS

À minha família, que me ensinou os valores da educação, da fé e da importância do conhecimento. Obrigada pelo apoio e estrutura, por se esforçarem tanto em garantir meu futuro, por me preencherem com amor e alegria e por serem pessoas tão boas. Obrigada por me ensinarem que tudo que eu faço, devo fazer com amor. Devo tudo à vocês.

Ao meu oditchan, pelas histórias interessantes e longas conversas, por me ensinar o valor do caráter. Sinto muito sua falta.

Agradeço pelo companheiro de vida e profissão, Gustavo Moraes Ramos Valladão. Pra mim você é um exemplo a ser seguido, repleto de bondade e paciência, sábio como profissional e como ser humano. Obrigada por me ajudar a melhorar em tudo e sempre. Sou grata à sua família, por serem tão alegres e bons para mim.

Sou grata à minha orientadora Prof. Dra. Fabiana Pilarski, por ter me estimulado a viajar, conhecer novos laboratórios e por me mostrar a importância de investir em qualidade de vida. Obrigada pelos ensinamentos, pela confiança, amizade, carinho, e de toda sua família. Você me ensinou a ver tudo com mais calma e com você eu pude vivenciar os melhores momentos da minha fase inicial de pesquisadora.

Agradeço à Suzana e Lindomar por eu nunca ter que pedir ajuda pra vocês, pois sempre faziam tudo, antes de eu pedir. Obrigada por exigirem de mim o melhor, e por executarem as análises até a perfeição. Vocês são grandes amigos e grandes pesquisadores.

Agradeço ao Prof. Dr. Diogo, por também me orientar durante todo o doutorado. Obrigada pelos ensinamentos e pela fantástica oportunidade de realizar parte das minhas pesquisas em seu laboratório, um lugar maravilhoso.

Agradeço aos alunos e professores que pude conhecer de outras Universidades (Universidade de Passo Fundo, Wageningen University e Universidad del Chile), por me ensinarem tanto, e por me mostrarem outras culturas. Agradeço em especial aos professores

Dr. Geert F. Wiegertjes e Dr. Luiz Carlos Kreutz, pelas oportunidades e ensinamentos e à Karina Schreiner Kirsten, pelos ensinamentos dos desenhos dos primers, análises e interpretações do qPCR.

Sou grata à Jaqueline Custódio e Milene Elissa Hata pelos ensinamentos nas extrações de RNA, ao Inácio Assane pelos ensinamentos sobre antibióticos e ao Raphael Barbeta pelos ensinamentos em isolamento de leucócitos. Agradeço aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos pelo auxílio nas análises da presente tese e de diversos outros trabalhos que executamos durante meu doutorado. Obrigada pela amizade de todos vocês.

Sou grata aos colegas dos Laboratórios de Fisiologia, Genética e Reprodução, e aos professores e funcionários pelo aprendizado diário. Vocês foram a minha família durante o mestrado e doutorado. Sentirei muito a falta de conviver com a alegria de vocês.

Agradecimentos à Dra. Vany P. Ferraz (Departamento de Química – UFMG) pelo auxílio com as análises dos óleos essenciais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) - Código de Financiamento 431713/2016-2 e 305007/2016-5.

RESUMO

As enfermidades têm se destacado como um dos principais entraves para o desenvolvimento da aquicultura, e apesar do tambaqui *Colossoma macropomum* ser a espécie nativa mais produzida na América do Sul, pouco conhecemos sobre as enfermidades que o afetam e como o seu mecanismo imune reage frente às infecções. A septicemia hemorrágica é causada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*, e se destaca como uma das principais enfermidades na aquicultura, principalmente em espécies tropicais. Por isso, confirmamos a patogenicidade de *A. hydrophila* pelo Postulado de Koch e estabelecemos as doses letais até 80%, estimando a DL₅₀ em 5, 57 x 10⁷ a 1, 41 x 10⁸ UFC/ml. Não recomendamos o verde malaquita como recurso profilático e indicamos ceftriaxona, florfenicol, oxitetraciclina, sulfazotrim e tianfenicol como potenciais antimicrobianos para o controle desta bactéria, mas consideramos os óleos essenciais de cravo *Eugenia caryophyllata* e canela *Cinnamomum zeylanicum* como melhores opções para potencial tratamento da bacteriose, com forte atividade inibitória. Descrevemos um perfil leucocitário incomum de severa leucopenia em período agudo de infecção, devido à liberação de armadilhas extracelulares pelos leucócitos (ETosis). ETosis é um mecanismo de suicídio leucocitário, ainda não descrito para a maioria dos peixes, e que pode ser considerado como um dos últimos recursos imunes adotado pelo hospedeiro para tentar conter a infecção. Este mecanismo pode ser visualizado através de uma metodologia de baixo custo e de fácil execução em microscopia eletrônica de varredura, desenvolvida nesta tese. Como os estudos genéticos beneficiam substancialmente o desenvolvimento da criação de uma espécie, a sequência parcial genética de peptídios antimicrobianos (HSP70, lisozima e proteínas do sistema complemento), receptor de citocina e citocinas (IRAK 1, IL-1 β e IL-10) foram descritas. Padrões de expressões

genéticas foram caracterizadas quanto a modulação de cada gene, em resposta às diferentes fases de infecção por *A. hydrophila*. A modulação das expressões dos genes imunes mostrou-se aumentada em peixes infectados, tanto na fase inicial da infecção (principalmente em torno de 6h e 24h) quanto na fase crônica (7d e 14d). Apenas o gene associado à regulação térmica, HSP70, mostrou-se negativamente modulado em peixes infectados. Destacamos o aumento na expressão dos genes de citocinas e lisozima, evidenciando atividade pró e antiinflamatórias. Porém, o maior destaque é dado para os genes HSP70 e proteínas do sistema complemento: C3 e C4. A modulação dos genes de HSP70 foi afetada negativamente em peixes infectados, sugerindo que peixes afetados por *A. hydrophila* ficam mais propícios à sensibilidade térmica e às infecções secundárias. Com relação às proteínas do sistema complemento, apesar da regulação aumentada na expressão do gene C4, seguindo a tendência pró-inflamatória, o gene C3 surpreendentemente não foi expresso na maioria dos peixes saudáveis e infectados. Adicionalmente, na análise de do sistema complemento no soro, a ausência de atividade hemolítica corrobora com os resultados de expressão gênica, sugerindo provável deficiência no sistema complemento desta espécie, nas condições testadas. A ausência de dados na literatura e as possíveis razões para a regulação da expressão gênica e associação com doenças de peixes são abordadas nesta tese.

Palavras-chaves: aquicultura, bacteriose, imunidade inata, peixe, peixe nativo, septicemia hemorrágica

ABSTRACT

Diseases have emerged as one of the main obstacles to aquaculture development, and although tambaqui *Colossoma macropomum* is the most produced native species in South America, little is known about the diseases that affect this fish and how its immune mechanism reacts to infection. Hemorrhagic septicemia is caused by the bacterium *Aeromonas hydrophila*, and stands out as one of the major diseases in aquaculture, especially in tropical species. Therefore, we confirmed the pathogenicity of *A. hydrophila* by the Koch's Postulate and established the lethal doses up to 80%, estimating the LD₅₀ at 5.57×10^7 to 1.41×10^8 CFU/ml. We do not recommend malachite green as a prophylactic resource and we recommend ceftriaxone, florfenicol, oxytetracycline, sulphazotrin and thiamphenicol as potential antimicrobials for this bacterium control, but we consider the essential oils of clove *Eugenia caryophyllata* and cinnamon *Cinnamomum zeylanicum* as the best options for potential treatment of bacteriosis, with strong inhibitory activity. We describe an unusual leukocyte profile with severe leukopenia during acute infection due to the release of leukocyte extracellular traps (ETosis). ETosis is a mechanism of leukocyte suicide, not described yet for most of fish species, and it can be considered as one of the last immune mechanisms adopted by the host to try to contain the infection. This mechanism can be visualized through a low-cost and of easy-execution methodology, developed in this thesis. As the genetic studies substantially benefit the development of a species farming, the genetic partial sequence of antimicrobial peptides (HSP70, lysozyme and complement system proteins), cytokine receptor and cytokines (IRAK 1, IL-1 β and IL-10) were described. The patterns of gene expression were characterized for of each gene in response to the different stages of *A. hydrophila* infection. The immune gene expression was shown to be increased

in infected fish, both in the initial phase of infection (mainly around 6h and 24h) and in the chronic phase (7d and 14d). Only the gene associated with thermal regulation, HSP70, was shown to be down-regulated in infected fish. We highlight the modulation of cytokine and lysozyme genes, evidencing pro and antiinflammatory activities. However, a great prominence is given to the genes related to HSP70 and complement system proteins: C3 and C4. The HSP70 gene was down-regulated in infected fish, suggesting that fish affected by *A. hydrophila* are more susceptible to thermal sensitivity and secondary infections. Regarding complement system proteins, although C4 gene regulation follows a pro-inflammatory trend, the C3 gene was surprisingly not expressed in most healthy and infected fish. Additionally, in the analysis of the complement system in the serum, the absence of hemolytic activity corroborates with the results of gene expression, suggesting a probable deficiency in the complement system of this species, under the conditions tested. The lack of data in the literature and the possible reasons for the regulation of gene expression and association with fish diseases are addressed in this thesis.

Key-words: aquaculture, bacteriosis, fish, hemorrhagic septicemia, innate immunity, native fish.

Capítulo 1

1. Revisão bibliográfica

1.1. Aquicultura: cenário atual e tendências para a produção de tambaqui

Os últimos dados divulgados pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) em Sofia (2018) demonstram que o continente Americano é o segundo maior produtor mundial de peixes, atrás apenas do continente Asiático (composto por países como a China, que é o maior produtor mundial) (Sofia, 2018). Por isso, se excluirmos as regiões geográficas abrangidas pelo continente Asiático, a América do Sul passa a ser a maior produtora mundial de peixes (Sofia, 2018). E, dentre os países Americanos, o Brasil se destaca como o 13º maior produtor mundial. Ainda, se considerarmos apenas as espécies produzidas em águas continentais, o Brasil passa a ser o 8º maior produtor mundial (Sofia, 2018) e principal produtor do continente Americano (Valladão *et al.*, 2018).

A piscicultura no Brasil é favorecida pela diversidade de espécies de peixes, disponibilidade de recursos naturais, condições climáticas propícias para a produção das espécies continentais, além da disponibilidade de insumos em quase todo o país. Nos últimos dados divulgados pelo IBGE (referentes à 2017), o Brasil produziu mais de 485 mil toneladas de peixes no ano, correspondendo quase 70% da produção aquícola. Dentre uma enorme variedade de peixes exóticos e nativos com potencial para a aquicultura, o tambaqui, *Colossoma macropomum* se destaca por ser o peixe nativo mais produzido no Brasil (Valladão *et al.*, 2018), totalizando 18,2% da piscicultura nacional (IBGE, 2017). No Brasil, espera-se que nos próximos anos, a tendência de crescimento na produção de espécies nativas ultrapasse a de espécies exóticas, assim como ocorreu historicamente em outros países representativos em produção de peixes (Valladão *et al.*, 2018).

O tambaqui *C. macropomum*, descrito como black pacu nas estatísticas da FAO, ou conhecido por cachama em diversos países da América Latina, é um peixe caraciforme,

nativo da Bacia Amazônica. Adaptado às águas quentes, é um animal sensível às variações térmicas (Hashimoto *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2018; Valladão *et al.*, 2018), mas se destaca quanto ao potencial produtivo devido seu hábito zooplanctófago, fácil reprodução (Moro *et al.* 2013) e por ser resistente às situações de hipóxia extrema e baixo pH (Wood *et al.*, 2017). Por ter a carne muito apreciada pelos consumidores, este peixe apresenta um alto valor cultural e comercial para diversos países da América do Sul, com destaque para o Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela, Bolívia e Equador (Valladão *et al.*, 2018). A produção do tambaqui cresce anualmente no país, com destaque para o estado de Rondônia, que é o maior produtor, seguido do Amazonas, Maranhão, Roraima, Pará e Tocantins, e atualmente, sua criação tem se expandido para outros estados, principalmente aqueles de clima quente, como Norte, Nordeste e Centro-Oeste (IBGE, 2017).

Como um fato comum e histórico em diversos países, a tendência futura é de que a produção de peixes nativos ultrapasse a dos peixes exóticos na América do Sul (Valladão *et al.*, 2018), assim como a produção de tambaqui que já ultrapassou a dos ciprinídeos no Brasil e em breve poderá alcançar a produção da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus*. No entanto, com a intensificação da produção do tambaqui, assim como de qualquer outra espécie, ocorre o surgimento de problemas sanitários que podem afetar economicamente a produção, inviabilizando sua comercialização dentro e fora do país.

Pesquisadores concordam que o aparecimento de enfermidades infecciosas na aquicultura está frequentemente associado a elevada quantidade de matéria orgânica nos viveiros de produção, decorrente da alta densidade de estocagem e elevado arraçoamento (uso massivo de ração comercial), além de ser facilitado pelo manejo inadequado e estressante. Assim, baseado nos aspectos atuais da produção do tambaqui e as perdas ocasionadas pelas doenças, o conhecimento sobre agentes etiológicos e a relação destes com o hospedeiro se faz necessário.

3. Referências

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2014). Em: Basic immunology: functions and disorders of the immune system. *Elsevier Health Sciences*, 5th Edition. 352p.

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2018). Em: Cellular and molecular

immunology. *Elsevier Health Sciences*, 9th Edition. 608p.

Abdelhamed, H., Ibrahim, I., Baumgartner, W., Lawrence, M.L., Karsi, A. (2017). Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1519. Doi: 10.3389/fmicb.2017.01519

Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.D. (2003). Interleukin-10 therapy- review of a new approach. *Pharmacological reviews*, 55(2), 241-269. Doi: 10.1124/pr.55.2.4

Austin, B., Austin, D.A. (2016). Characteristics of the diseases. Em: *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*. *Springer*, 6th Edition, 721p.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., dos Santos, L.R., da Motta, A.C., Ritter, F., Bedin, A.C., da Silva, L.B. (2008). *Aeromonas hydrophila* in *Rhamdia quelen*: macroscopic and microscopic aspect of the lesions and antibiotic resistance profiles. *Boletim do Instituto de Pesca* 34(3): 355-363. Disponível em: https://www.pesca.agricultura.sp.gov.br/34_3_355-363.pdf

Baumgartner, W.A., Ford, L., Hanson, L. (2017). Lesions caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in farmed catfish (*Ictalurus punctatus* and *I. punctatus* × *I. furcatus*) in Mississippi. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(5), 747-751. Doi: 10.1177/1040638717708584

Biller-Takahashi, J.D., Montassier, H.J., Takahashi, L.S., Urbinati, E.C. (2016). Levamisole promotes an adjuvant effect on the immunity of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) when immunized with *Aeromonas hydrophila*, even when provided in the diet. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 164-173. Doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.11.008

Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 239-262. Doi: 10.1016/j.fsi.2005.04.004

Brinkmann, V., Laube, B., Abed, U.A., Goosmann, C., Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (36). Doi: 10.3791/1724

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535. Doi: 10.1126/science.1092385

Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, 198(5), 773-783. Doi: 10.1083/jcb.201203170

Brogden, G., Krimmling, T., Adamek, M., Naim, H.Y., Steinhagen, D., Köckritz-Blickwede, M.V. (2014). The effect of β -glucan on formation and functionality of neutrophil extracellular traps in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 44(2), 280-285. Doi: 10.1016/j.dci.2014.01.003

Brogden, G., Köckritz-Blickwede, M.V., Adamek, M., Reuner, F., Jung-Schroers, V., Naim, H.Y., Steinhagen, D. (2012). β -Glucan protects neutrophil extracellular traps against degradation by *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 1060-1064. Doi: 10.1016/j.fsi.2012.08.009

Carballo, C., Castro, D., Borrego, J.J., Manchado, M. (2017). Gene expression profiles associated with lymphocystis disease virus (LCDV) in experimentally infected Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, 66, 129-139. Doi: 10.1016/j.fsi.2017.04.028

Chen, H.H., Lin, H.T., Fong, Y.F., Lin, J.H.Y. (2012). The bioactivity of teleost IL-6: IL-6 protein in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) induces Th2 cell differentiation pathway and antibody production. *Developmental & Comparative Immunology*, 38(2), 285-294. Doi: 10.1016/j.dci.2012.06.013

Chen, M., Liu, S., Yan, F., Zhou, E., Zhong, X., Ding, M., Ye, J. (2019). Complement 1q-binding protein from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular characterization, expression pattern upon bacterial infection and its binding properties. *Aquaculture*, 500, 31-40. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.060

Chow, O.A., Köckritz-Blickwede, M.V., Bright, A.T., Hensler, M.E., Zinkernagel, A.S., Cogen, A.L., Gallo, R.L., Monestier, M., Wang, Y., Glass, G.K., Nizet, V. (2010). (2010). Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host & Microbe*, 8(5), 445-454. Doi: 10.1016/j.chom.2010.10.005.

Costa, J.C., Valladão, G.M.R., Pala, G., Gallani, S.U., Kotzent, S., Crotti, A.E.M., Fracarolli L., Silva, J.J.M., Pilarski, F. (2017). *Copaifera duckei* oleoresin as a novel alternative for treatment of monogenean infections in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*, 471, 72-79. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.11.041

Dang, W., Lu, H., Gao, Y., Xu, N., Qu, T., Liu, Y. (2015). Molecular analysis of inducible Heat shock protein 70 of *Pelodiscus sinensis* and its effects during pathogen (*Aeromonas hydrophila*) infection. *Aquaculture*, 442, 93-99. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.02.030

Denkers, E., Abi Abdallah, D. (2012). Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Frontiers in Immunology*, 3, 382. Doi: 10.3389/fimmu.2012.00382

Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., Luque, J.L. (2012). Checklist of protozoan parasites of fishes from Brazil. *Zootaxa*, 3221, 1-25. ISSN 1175-5334

Ellis, A.E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 827-839. Doi: 10.1016/S0145-305X(01)00038-6

Fernandes, E.M., de Almeida, L.C.F., Hashimoto, D.T., Lattanzi, G.R., Gervaz, W.R., Leonardo, A.F., Neto, R.V.R. (2018). Survival of purebred and hybrid *Serrasalminidae*

under low water temperature conditions. *Aquaculture*, 497, 97-102. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.030

Goldmann, O., Medina, E. (2013). The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Frontiers in Immunology*, 3, 420. Doi: 10.3389/fimmu.2012.00420

Gou, C., Wang, J., Wang, Y., Dong, W., Shan, X., Lou, Y., Gao, Y. (2018). Hericium caput-medusae (Bull.: Fr.) Pers. polysaccharide enhance innate immune response, immune-related genes expression and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 72, 604-610. Doi: 10.1016/j.fsi.2017.11.027

Guimarães-Costa, A.B., Nascimento, M.T., Wardini, A.B., Pinto-da-Silva, L.H., Saraiva, E.M. (2012). ETosis: a microbicidal mechanism beyond cell death. *Journal of Parasitology Research*, 1-11. Doi: 10.1155/2012/929743

Hamid, N.H., Hassan, M.D., Sabri, M.M., Hasliza, A.H., Hamdan, R.H., Afifah, M.N., Raina, M.S., Nadia, A.B.S., Fuad, M.M. (2017). Studies on pathogenicity effect of *Aeromonas hydrophila* infection in juvenile red hybrid tilapia *Oreochromis* sp.. *Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology*, 532-539.

Hashimoto, D.T., Senhorini, J.A., Foresti, F., Porto-Foresti, F. (2012). Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. *Reviews in Aquaculture*, 4(2), 108-118. Doi: 10.1111/j.1753-5131.2012.01067.x

Hernández, A.J., Romero, A., Gonzalez-Stegmaier, R., Dantagnan, P. (2016). The effects of supplemented diets with a phytopharmaceutical preparation from herbal and macroalgal origin on disease resistance in rainbow trout against *Piscirickettsia salmonis*. *Aquaculture*, 454, 109-117. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.12.016

Hong, S., Li, R., Xu, Q., Secombes, C.J., Wang, T. (2013). Two types of TNF- α exist

in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- α 3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Immunology*, 191(12), 5959-5972. Doi: 10.4049/jimmunol.1301584

Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A., Sun, Y.Z. (2015). Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(4), 315-328. Doi: 10.1080/23308249.2015.1052365

Hu, B., Chen, B., Mao, M., Chen, M., Liu, X., Cui, Q., Liu, Y., Jiang, C. (2018). Molecular characterization and expression analysis of the interleukin 1b gene in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 88, 213-218. Doi: 10.1016/j.dci.2018.07.025

Ibge (2017). *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>.

Jerônimo, G.T., de Pádua, S.B., de Andrade Belo, M.A., Chagas, E.C., Taboga, S.R., Maciel, P.O., Martins, M.L. (2017). *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. *Aquaculture*, 469, 124-127. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.11.027

Jirapongpaiboj, W., Kobayashi, K., Fukuda, Y., Takano, T., Sakai, T., Matsuyama, T., Nakayasu, C., Nozaki, R., Hirono, I., Kondo, H. (2015). Development of consensus qPCR primers to detect cytokine genes in three amberjack species: *Seriola quinqueradiata*, *S. lalandi* and *S. dumerili*. *Fisheries Science*, 81(5), 907-914. Doi: 10.1007/s12562-015-0913-4

Karan, S., Dash, P., Kaushik, H., Sahoo, P.K., Garg, L.C., Dixit, A. (2016). Structural and functional characterization of recombinant interleukin-10 from Indian major carp *Labeo rohita*. *Journal of Immunology Research*, 1-12. Doi: 10.1155/2016/3962596

Keshari, R.S., Jyoti, A., Dubey, M., Kothari, N., Kohli, M., Bogra, J., Barthwal, M.K., Dikshit, M. (2012). Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition. *PloS One*, 7(10), e48111. Doi: 10.1371/journal.pone.0048111

Kreutz, L.C., Pavan, T.R., Alves, A.G., Correia, A.G., Barriquel, B., Santos, E.D., Barcellos, L.J.G. (2014). Increased immunoglobulin production in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to agrichemicals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(6), 499-504. Doi:10.1590/1414-431X20143890

Kreutz, L.C. (2017). Resposta imunológica contra vírus. Sistema complemento. Em Flores, E. F. *Virologia veterinária. Santa Maria: UFSM*, 3rd Edition. 1136p.

Kumaresan, V., Pasupuleti, M., Paray, B.A., Al-Sadoon, M.K., Arockiaraj, J. (2019). Gene profiling of antimicrobial peptides, complement factors and MHC molecules from the skin transcriptome of *Channa striatus* and its expression pattern during *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 48-55. Doi: 10.1016/j.fsi.2018.09.061

Liao, C.L., Zhang, G.R., Zhu, D.M., Ji, W., Shi, Z.C., Jiang, R., Fan, Q., Wei, K.J. (2018). Molecular cloning and expression analysis of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor type I genes in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Responses to challenge of *Edwardsiella ictaluri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 223, 1-15. Doi: 10.1016/j.cbpb.2018.05.001

Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A., Froysadal, E. (1989). Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 6(1), 1-5.

Lin, A.M., Rubin, C.J., Khandpur, R., Wang, J.Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E.C., Shah, P., Kaplan, M.J., Bruce, A.T. (2011). Mast cells and neutrophils

release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *The Journal of Immunology*, 1100123. Doi: 10.4049/jimmunol.1100123

Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137-151. Doi: 10.1016/j.fsi.2004.09.006

Magnadóttir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, 12(4), 361-379. Doi: 10.1007/s10126-010-9279-x

Martinelli, S., Urosevic, M., Daryadel, A., Oberholzer, P.A., Baumann, C., Fey, M. F., Dummer, R., Simon, H., Yousefi, S. (2004). Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular traps formation during neutrophil differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. Doi: 10.1074/jbc.M405883200

Matsumoto, M., Amer, M.T., Araki, K., Nishitani, A., Hayashi, K., Takeuchi, Y., Shiozaki, K., Yamamoto, A. (2018). Amberjack *Seriola dumerili* interleukin-10 negatively suppresses host cell-mediated immunity. *Fisheries Science*, 84(5), 857-867. Doi: 10.1007/s12562-018-1223-4

Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L.T. (2015a). Complement system part I—molecular mechanisms of activation and regulation. *Frontiers in Immunology*, 6, 262. Doi: 10.3389/fimmu.2015.00262

Merle, N.S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L.T. (2015b). Complement system part II: role in immunity. *Frontiers in Immunology*, 6, 257. Doi: 10.3389/fimmu.2015.00257

Miyata, T., Fan, X. (2012). A second hit for TMA. *Blood*, 120(6), 1152-1154. Doi: 10.1182/blood-2012-06-433235

Moro G.V., Rezende F.P., Alves A.L., Hashimoto D.T., Varela E.S., Torati L.S. (2013). Em: Piscicultura de água doce: Multiplicando conhecimentos. *Embrapa*, 1ª Edição, 440 p.

Nagasawa, T., Nakayasu, C., Rieger, A.M., Barreda, D.R., Somamoto, T., Nakao, M. (2014). Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. *Frontiers in Immunology*, 5, 445. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00445

Nakao, M., Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T.K., Somamoto, T. (2011). The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1296-1308. Doi: 10.1016/j.dci.2011.03.003

Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 807-825. Doi: 10.1016/S0145-305X(01)00037-4

Nonaka, M.I., Terado, T., Kimura, H., Nonaka, M. (2017). Evolutionary analysis of two complement C4 genes: Ancient duplication and conservation during jawed vertebrate evolution. *Developmental & Comparative Immunology*, 68, 1-11. Doi: 10.1016/j.dci.2016.11.009

Ogundele, M.O. (1998). A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: modulation of serum complement activation. *Mediators of Inflammation*, 7(5), 363-365. Doi: 10.1080/09629359890893

OIE (Office International des Epizooties/World Animal Health Organization) (2005a) Immediate notification report 6307

OIE, Paris OIE (Office International des Epizooties/World Animal Health Organization) (2005b) White spot disease in Brazil. report 1. 18:248–249

Palić, D., Andreasen, C.B., Ostojić, J., Tell, R.M., Roth, J.A. (2007a). Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *Journal of Immunological Methods*, 319(1-2), 87-97. Doi: 10.1016/j.jim.2006.11.003

Palić, D., Ostojić, J., Andreasen, C.B., Roth, J.A. (2007b). Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(8), 805-816. Doi: 10.1016/j.dci.2006.11.010

Pang, M., Jiang, J., Xie, X., Wu, Y., Dong, Y., Kwok, A.H., Zhang, W., Yao, H., Leung, F.C., Liu, Y. (2015). Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. *Scientific Reports*, 5, 9833. Doi: 10.1038/srep09833

Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 134. Doi: 10.1038/nri.2017.105

Peatman, E., Mohammed, H., Kirby, A., Shoemaker, C. A., Yildirim-Aksoy, M., Beck, B. H. (2018). Mechanisms of pathogen virulence and host susceptibility in virulent *Aeromonas hydrophila* infections of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 482, 1-8. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.09.019

Peng, M., Niu, D., Chen, Z., Lan, T., Dong, Z., Tran, T. N., Li, J. (2017). Expression of a novel complement C3 gene in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune response and hemolysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 73, 184-192. Doi: 10.1016/j.dci.2017.03.027.

Pereira, J. N., Morey, G. A. M. (2018). First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (*Eoacantocephala*, *Neochinorhynchidae*) on *Colossoma macropomum* (*Characidae*) in a fish farm in Roraima, Brazil. *Acta Amazonica*, 48(1), 42-45.

Pijanowski, L., Golbach, L., Kolaczowska, E., Scheer, M., Verburg-van Kemenade, B. M. L., Chadzinska, M. (2013). Carp neutrophilic granulocytes form extracellular traps via ROS-dependent and independent pathways. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5), 1244-1252. Doi: 10.1016/j.fsi.2013.02.010

Plumb, J. A. (2018). Health maintenance of cultured fishes: principal microbial diseases. *CRC Press*, 3rd Edition, 400p.

Reichel, M., Muñoz-Caro, T., Contreras, G. S., García, A. R., Magdowski, G., Gärtner, U., Taubert, A., Hermosilla, C. (2015). Harbour seal (*Phoca vitulina*) PMN and monocytes release extracellular traps to capture the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Developmental & Comparative Immunology*, 50(2), 106-115. Doi: 10.1016/j.dci.2015.02.002

Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. (2018). Biological and Ecological Roles of External Fish Mucus: A Review. *Fishes*, 3(4), 41. Doi: 10.3390/fishes3040041

Rombout, J.H.W.M., Huttenhuis, H.B.T., Picchiatti, S., Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5), 441-455. Doi: 10.1016/j.fsi.2005.03.007

Santos, E.F., Tavares-Dias, M., Pinheiro, D.A., Neves, L.R., Marinho, R.D.G.B., Dias, M.K.R. (2013). Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no Estado do Amapá, Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, 43 (1), 105-112. Doi: 10.1590/S0044-59672013000100013.

Saurabh, S., Sahoo, P.K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3), 223-239. Doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x

Shahi, N., Ardó, L., Fazekas, G., Gócza, E., Kumar, S., Rèvész, N., Sándor, Z.J., Molnár, Z., Jeney, G, Jeney, Z. (2018). Immunogene expression in head kidney and spleen of common carp (*Cyprinus carpio* L.) following thermal stress and challenge with Gram-negative bacterium, *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture International*, 26(3), 727-741. Doi: 10.1007/s10499-018-0250-6

Sebastião, F.A., Furlan, L.R., Hashimoto, D.T., Pilarski, F. (2015). Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. *Advances in Microbiology*, 5(06), 409. Doi: 10.4236/aim.2015.56042

Secombes, C.J., Fletcher, T.C. (1992). The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 53-71. Doi: 10.1016/0959-8030(92)90056-4

Secombes, C.J., Wang, T., Bird, S. (2011). The interleukins of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1336-1345. Doi: 10.1016/j.dci.2011.05.001

Sfacteria, A., Brines, M., Blank, U. (2015). The mast cell plays a central role in the immune system of teleost fish. *Molecular Immunology*, 63(1), 3-8. Doi: 10.1016/j.molimm.2014.02.007

Shan, S.J., Liu, D.Z., Wang, L., Zhu, Y.Y., Zhang, F.M., Li, T., An, L.G., Yang, G.W. (2015). Identification and expression analysis of irak1 gene in common carp *Cyprinus carpio* L.: indications for a role of antibacterial and antiviral immunity. *Journal of Fish Biology*, 87(2), 241-255. Doi: 10.1111/jfb.12714.

Shoemaker, C.A., Mohammed, H.H., Bader, T.J., Peatman, E., Beck, B.H. (2018). Immersion vaccination with an inactivated virulent *Aeromonas hydrophila* bacterin protects hybrid catfish (*Ictalurus punctatus* X *Ictalurus furcatus*) from motile *Aeromonas* septicemia. *Fish & Shellfish Immunology*, 82, 239-242. Doi: 10.1016/j.fsi.2018.08.040

Simon, D., Radonjic-Hösli, S., Straumann, A., Yousefi, S., Simon, H.U. (2015). Active eosinophilic esophagitis is characterized by epithelial barrier defects and eosinophil extracellular trap formation. *Allergy*, 70(4), 443-452. Doi: 10.1111/all.12570

Sindan (2018). Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. *Compêndio de Produtos Veterinários*. Disponível em <http://www.cpvvs.com.br/cpvvs>

Sofia (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Disponível em <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>

Tavares-Dias, M., Martins, M.L. (2017). An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(4), 913-918. Doi: 10.1007/s12639-017-0938-y

Tizard, I. (2014). *Imunologia Veterinária*. Elsevier, 9th Edition, 568p.

Tran, H.B., Chen, S.C., Chaung, H.C., Cheng, T.C. (2019). Molecular cloning of IL-6, IL-10, IL-11, IFN- γ and modulation of pro-and anti-inflammatory cytokines in cobia (*Rachycentron canadum*) after *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 230, 10-18. Doi: 10.1016/j.cbpb.2019.01.004

Ueki, S., Tokunaga, T., Fujieda, S., Honda, K., Hirokawa, M., Spencer, L.A., Weller, P.F. (2016). Eosinophil extracellular trap cell death–derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(1), 258-267. Doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.041

Urban, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4), 668-676. Doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x

Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F. (2018). South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 351-369. Doi: 10.1111/raq.12164

Veenstra, K.A., Wangkahart, E., Wang, T., Tubbs, L., Arous, J.B., Secombes, C.J. (2018). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) adipose tissue undergoes major changes in immune gene expression following bacterial infection or stimulation with pro-inflammatory

molecules. *Developmental & Comparative Immunology*, 81, 83-94. Doi: 10.1016/j.dci.2017.11.001

Wang, E., Liu, T., Wu, J., Wang, K., Chen, D., Geng, Y., Huang, X., Ouyang, P., Lai, W., Ai, X. (2019). Molecular characterization, phylogenetic analysis and adjuvant effect of channel catfish interleukin-1 β s against *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 155-165. Doi: 10.1016/j.fsi.2019.01.007

Wartha, F., Henriques-Normark, B. (2008). ETosis: a novel cell death pathway. *Science Signaling*, 1(21), pe25-pe25. Doi: 10.1126/stke.121pe25

Webster, S.J., Daigneault, M., Bewley, M.A., Preston, J.A., Marriott, H.M., Walmsley, S.R., Read, R.C., Whyte, M.K.B., Dockrell, D.H. (2010). Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *The Journal of Immunology*, 1000805. Doi: 10.4049/jimmunol.1000805

Wood, C.M., de Souza Netto, J.G., Wilson, J.M., Duarte, R.M., Val, A.L. (2017). Nitrogen metabolism in tambaqui (*Colossoma macropomum*), a neotropical model teleost: hypoxia, temperature, exercise, feeding, fasting, and high environmental ammonia. *Journal of Comparative Physiology B*, 187(1), 135-151. Doi: 10.1007/s00360-016-1027-8

Xu, D.H., Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. (2012). Parasitism by protozoan *Ichthyophthirius multifiliis* enhanced invasion of *Aeromonas hydrophila* in tissues of channel catfish. *Veterinary Parasitology*, 184(2-4), 101-107. Doi: 10.1016/j.vetpar.2011.09.020

Yano, T. (1996). The nonspecific immune system: humoral defense. The fish immune system: organism, pathogen, and environment. *Elsevier*, 1st Edition, 380p.

Yoshiura, Y., Kiryu, I., Fujiwara, A., Suetake, H., Suzuki, Y., Nakanishi, T., Ototake, M. (2003). Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian

interleukin-12 subunits. *Immunogenetics*, 55(5), 296-306. Doi: 10.1007/s00251-003-0582-9

Zhang, X.T., Zhang, G.R., Shi, Z.C., Yuan, Y.J., Zheng, H., Lin, L., Wei, K.J., Ji, W. (2017). Expression analysis of nine Toll-like receptors in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) responding to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 63, 384-393. Doi: 10.1016/j.fsi.2017.02.021

Zhao, L., Tu, J., Zhang, Y., Wang, J., Yang, L., Wang, W., Wu, Z., Meng, Q., Lin, L. (2016). Transcriptomic analysis of the head kidney of Topmouth culter (*Culter alburnus*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on phagosome pathway. *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 413-418. Doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.001

Zou, J., Secombes, C.J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1376-1387. Doi: 10.1016/j.dci.2011.07.001

Zou, J., Secombes, C.J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2), 23. Doi:10.3390/biology5020023

Capítulo 5

Considerações Finais

O sucesso produtivo de uma espécie de peixe, requer o domínio do conhecimento de todos os aspectos sanitários básicos, já que, atualmente, as enfermidades são apontadas por muitos estudiosos como o principal entrave para o desenvolvimento da aquicultura mundial. Por isso, nossos estudos foram baseados na atual necessidade de informações para a criação do tambaqui.

Na tese destacamos que o tambaqui é o peixe nativo mais produzido na América do Sul, e que é comum produtores terem problemas de mortalidade em sua produção. Apesar disto, na literatura, não foram encontrados dados que confirmassem a identidade e patogenicidade da *Aeromonas* neste peixe. O nosso primeiro estudo confirmou, através do cumprimento do Postulado de Koch e estudo de letalidade, que a *Aeromonas hydrophila* causa doença e septicemia hemorrágica em tambaqui. Além disto, baseado na confirmação da presença desta importante doença para o tambaqui, no primeiro estudo realizamos experimentos para encontrar moléculas promissoras para o controle da aeromonose. Como o uso de substâncias *off-label* é comum no tratamento de enfermidades na aquicultura, nesta tese, esclarecemos porque o uso de medicamentos deve ser previamente estudado, e mostramos o potencial dos óleos essenciais de plantas medicinais, antimicrobianos e desinfetantes no controle de *Aeromonas* no tambaqui.

Conforme citado ao longo do trabalho, apesar do sistema imune inato dos peixes ser um dos principais mecanismos de proteção contra patógenos, a resposta, que é intrínseca à cada espécie, não foi caracterizada no tambaqui até o momento. Por isso, no segundo estudo, avaliamos a imunidade inata (atividade antimicrobiana humoral e celular) no tambaqui, e os achados em peixes infectados incluíram principalmente uma leucopenia grave. Isto proporcionou novos estudos devido a suspeita da ocorrência da

morte celular de leucócitos para liberação de armadilhas extracelulares (ETosis), um mecanismo imune do hospedeiro para contenção da infecção. Ao ser investigado, desenvolvemos uma metodologia adaptada para visualização desta formação de armadilhas extracelulares por leucócitos em microscopia de varredura. Com este segundo estudo, descrevemos o mecanismo de ETosis pela primeira vez em um peixe nativo da América do Sul, e presumimos que este é um dos últimos recursos executados pelo tambaqui para conter a infecção. Evidenciamos que após essa estratégia, ele retorna a produção e liberação de um número elevado de células fagocitárias na circulação periférica.

Por fim, no terceiro estudo, estabelecemos os padrões de resposta imune inata do tambaqui, desvendando trechos parciais da sequência de 7 genes imunes chaves, o que poderá auxiliar futuros estudos de expressão gênica para esta espécie. A modulação da expressão gênica foi estabelecida em diferentes fases da infecção por *Aeromonas* pela primeira vez para este peixe nativo.

A partir dos próximos anos, a literatura sobre os peixes nativos será mais robusta e esta tese pode prover subsídios para a formulação de vacinas e tratamentos contra aeromonose na aquicultura, além de prover mais discussão sobre aspectos básicos da imunidade dos peixes sul-americanos abrindo portas para estudos mais aprofundados sobre o suicídio celular e sobre a expressão de genes imunes chaves em diferentes condições.