

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SEPSE AGUDA POR *Aeromonas hydrophila* EM *Piaractus mesopotamicus*: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E
MICROBIOLÓGICAS**

**Fausto de Almeida Marinho Neto
Médico Veterinário**

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**SEPSE AGUDA POR *Aeromonas hydrophila* EM *Piaractus mesopotamicus*: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E
MICROBIOLÓGICAS**

Fausto de Almeida Marinho Neto

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Coorientadores: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

Dr. Gustavo da Silva Claudiano

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal.

2016

Marinho-Neto, Fausto de Almeida
M338s Sepse aguda por *Aeromonas hydrophila* em *Piaractus mesopotamicus* : características morfológicas e microbiológicas / Fausto de Almeida Marinho Neto. – – Jaboticabal, 2016
ix, 45 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Coorientadores: Flávio Ruas de Moraes, Gustavo da Silva
Claudio
Banca examinadora: Rogério Salvador, Laura Satiko Okada
Nakaghi
Bibliografia

1. Aeromonose. 2. Fase aguda. 3. Histopatologia. 4. Microbiologia.
5. Pacu. 6. Septicemia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: netoalmarinho@hotmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fausto de Almeida Marinho Neto, filho de Vanderli Prela Marinho e José Mário de Melo Marinho, nasceu em 17 de outubro de 1991 em Ourinhos, São Paulo. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, onde se graduou em julho de 2014. Durante a graduação foi bolsista pela Fundação Araucária por três anos e desenvolveu projetos de Iniciação Científica na área de Microbiologia e Imunopatologia de peixes, sob a orientação da Prof. Dr. Rogério Salvador. Em agosto de 2014, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (mestrado), área de concentração Patologia Animal no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes, concluindo-o em outubro de 2016.

*“O pessimista olha para baixo e tropeça.
O otimista olha para cima e bate a cabeça.
O realista olha para frente e reajusta seu caminho.”*

Ezekiel – The Walking Dead

DEDICO

Ao meu tio Fausto Luís de Melo Marinho (*in memoriam*) que esteve sempre pronto para ajudar a todos. Médico competente, dedicado e atencioso. Obrigado por todos os socorros nas horas mais difíceis e por sempre me receber com aquele abraço acolhedor que só você sabia dar. Estará sempre em meu coração. Te amo!

AGRADECIMENTOS

À força maior que nos rege e move de maneira tão perfeita que nada deixa de acontecer sem que esteja predeterminado.

Aos meus pais, José Mário de Melo Marinho e Vanderli Praela Marinho, por todo o apoio, incentivo e amor. Aos meus irmãos, Juliane Praela Marinho e José Mário de Melo Marinho Junior, pela compreensão e conselhos. Ao meu avô, Fausto de Almeida Marinho, por ser meu exemplo e entender a distância durante esse tempo. Também a todos meus parentes que tanto me incentivaram e se orgulharam de onde cheguei. Amo todos vocês!

À Prof. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes por me proporcionar conhecimentos e oportunidades que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente. Não só abriu as portas de seu laboratório como também de sua casa, sou e sempre serei muito grato por toda devoção e tempo dispendido em minha orientação. Muito obrigado pela confiança depositada em mim!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes por sua alegria, disposição e prontidão em ajudar. Obrigado por todos os ensinamentos e risadas.

Ao meu também coorientador Dr. Gustavo da Silva Claudiano, que dividiu comigo a possibilidade de trabalhar nesse projeto, já que o presente trabalho é uma parte de sua tese de doutorado. Muito obrigado pelos ótimos momentos de aprendizagem, companheirismo, trabalho em equipe e amizade.

Aos meus amigos e colegas de equipe, os quais tive contato nesse tempo de mestrado: Paulo, Jefferson, Victor Alexander, Marina, Thalita, Thiago, Silas, Dayanne, Lygia, Isabela.

Aos amigos que fiz nessa jornada que tive em Jaboticabal e com certeza levarei para o resto de minha vida: Branca, Ana Cláudia, Victor Yunes, Nathan Cruz, Mayara Gonçalves, Jéssica Lage, Paulo Henrique (Pê), Maria Eduarda (Duda), Andresa, Marcela, Danilo Almeida, Rafael Peterossi, Gisele Valdetaro, Mayara Luzzi e tantos outros. Vocês todos são muito especiais fazem parte das minhas maiores conquistas nessa etapa da vida.

À minha amiga-irmã, Karina Kobashigawa (Tcháina), que entrou na minha vida só para acrescentar maravilhas. Obrigado por todos os momentos juntos, por

todas as conversas da vida, por todas as gordices, por não medir esforços em me fazer bem. Essa conexão inexplicável que temos estreitará qualquer distância.

Aos meus bons e velhos amigos de todas as épocas e lugares que estiveram presentes nessa etapa e torceram para que tudo desse certo.

Ao Rogério Salvador pela amizade e incentivo em seguir nessa área.

Aos membros das bancas de pré-qualificação, qualificação e defesa pelas sugestões e ensinamentos.

Aos técnicos do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV, Edgar, Theo, Francisca e às secretárias Moema e Mabel, pela simpatia e disposição para ajudar.

Aos animais utilizados nesse experimento, sem eles nada disso teria se concretizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no período de setembro de 2014 a abril de 2015.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal, em especial ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pela concessão da bolsa (Edital/Processo: 2015/01024-6) e fomento à pesquisa com o auxílio 2015/14289-8, além de todo suporte para realização deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que a elaboração desta dissertação fosse possível.

SUMÁRIO

Página

	CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
	RESUMO	iv
	ABSTRACT	v
	LISTA DE ABREVIATURAS	vi
	LISTA DE FIGURAS	vii
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	<i>Piscicultura</i>	2
2.2	<i>Aeromonose</i>	3
2.3	<i>Processo séptico</i>	4
2.4	<i>Aspectos morfológicos de doenças de peixes</i>	5
3	OBJETIVO	6
4	MATERIAL E MÉTODOS	6
4.1	<i>Peixes e condições de manutenção</i>	6
4.2	<i>Cepa bacteriana</i>	7
4.3	<i>Determinação da dose letal de 50 % (DL50%)</i>	7
4.4	<i>Delineamento experimental e indução da sepse</i>	8
4.5	<i>Coleta do material biológico</i>	8
4.6	<i>Exame clínico e alterações macroscópicas</i>	9
4.7	<i>Exames microbiológicos</i>	9
4.8	<i>Exame histopatológico</i>	9
4.9	<i>Exame ultraestrutural</i>	10
4.10	<i>Mortalidade</i>	10
4.11	<i>Análise estatística</i>	10
5	RESULTADOS	10
5.1	<i>Exame clínico e alterações macroscópicas</i>	10
5.2	<i>Exames microbiológicos</i>	14
5.3	<i>Exame histopatológico</i>	17
5.4	<i>Exame ultraestrutural</i>	25
5.5	<i>Mortalidade</i>	29

6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	36
8	REFERÊNCIAS.....	36



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 01471/15 do trabalho de pesquisa intitulado "Caracterização estrutural e ultraestrutural da infecção por *Aeromonas hydrophila* em *Piractus mesopotamicus*", sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Julieta Rodini Engrácia de Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de fevereiro de 2015.

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2015.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

**SEPSE AGUDA POR *Aeromonas hydrophila* EM *Piaractus mesopotamus*:
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E MICROBIOLÓGICAS**

RESUMO – Bactérias do gênero *Aeromonas* causam infecção caracterizada por septicemia, sendo a forma aguda desta afecção a mais prevalente em peixes. Esta bacteriose é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, ocasionando grandes perdas no setor de produção aquícola. Deste modo, o entendimento de sua fisiopatogenia é de suma importância ao desenvolvimento de estratégias voltadas à intervenção e controle da aeromonose em peixes. Este trabalho visou caracterizar por meio de estudos morfológicos e microbiológicos a fase aguda do processo séptico em diferentes tecidos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. Para isso, 160 pacus com peso médio de 250g foram inoculados por via celomática com *A. hydrophila* ($1,78 \times 10^9$ UFC/mL) e nos tempos pré-estipulados de 0 (controle), 1, 3, 6 e 9 horas pós-inoculação (hpi) os animais foram anestesiados e o material biológico coletado para realização de exames microbiológicos, histopatológicos e ultraestruturais. Foi evidenciada a presença de necrose, processos degenerativos, alterações vasculares e associação da bactéria a essas lesões nos tecidos estudados, principalmente 6 e 9 horas após a inoculação.

Palavras-chaves: aeromonose, fase aguda, histopatologia, microbiologia, pacu, septicemia

ACUTE SEPSIS CAUSED BY *Aeromonas hydrophila* IN *Piaractus mesopotamicus*: MORPHOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION

ABSTRACT – *Aeromonas* bacteria cause infection characterized by septicaemia and acute septicemic form of this disease is the most prevalent in fish. This bacteriosis is responsible for high morbidity and mortality rates, causing considerable losses in the aquaculture sector. Thus, understanding its pathophysiology is crucial to the development of strategies for intervention and control of fish aeromonosis. This study aimed to characterize by morphological and microbiological studies the acute phase of septic process in different tissues of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Hence, 160 pacus weighing approximately 250g were inoculated via coelomic route with *A. hydrophila* (1.78×10^9 CFU / mL) and pre-operative times of 0 (control), 1, 3, 6, and 9 hours post-inoculation (hpi) the animals were anesthetized and the biological material collected for performing microbiological, histopathological and ultrastructural analysis. They showed the presence of necrosis, degenerative processes, vascular damage and close association of the bacteria to these lesions in tissues, mainly 6 and 9 hours after inoculation.

Keywords: aeromonosis, acute phase, histopathology, microbiology, pacu, septicaemia

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
cm – Centímetro
Cppar – Centro de Pesquisas em Sanidade Animal
CM – Célula morta
CV – Célula viva
°C – Graus Celsius
DL50% – Dose letal de 50%
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EB – Energia bruta
FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
g – Grama
g – Giros
hpi – horas pós-inoculação
HE – Hematoxilina e Eosina
IL – Interleucina
kcal – quilocaloria
kg – Quilograma
L – Litro
LPS – Lipopolissacarídeo
M – Molar
MC – Membrana citoplasmática
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
mg – Miligrama
min – minuto
mL – Mililitro
mm – Milímetro
MN – Membrana nuclear
MN-E – Edema de membrana nuclear
MT – Mitocôndria
MT-E – Edema de mitocôndria
N – Núcleo
PB – Proteína bruta
pH – Potencial hidrogeniônico
RE – Retículo endoplasmático
RE-E – Edema de retículo endoplasmático
RNA – Ácido ribonucleico
SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF – Fator de necrose tumoral
TSA – Ágar trípico de soja
UFC – Unidade formadora de colônia
μL – Microlitro
μm – Micrômetro
μs – Microsiemens
USP – Universidade de São Paulo
Unesp – Universidade Estadual Paulista

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Alterações macroscópicas de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Peixe controle (sem alterações externas), barra. (B) Hemorragia cutânea (setas). (C) Hemorragia em nadadeiras (seta) e em opérculo (asterisco). (D) Brânquias normais (seta). (E) Congestão branquial (seta). (F) Hifema (seta). Barras A e B: 4 cm e barras C-F: 1 cm.12
- Figura 2 – Alterações macroscópicas de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Parede celomática normal. (B) Hemorragia petequial em parede celomática e serosa dos órgãos (setas), congestão de vasos (asterisco) e presença de líquido serosanguinolento em celoma (cabeça de seta). (C) Fígado (asterisco), baço (cabeça de seta) e intestino (seta) normais. (D) Congestão hepática e hepatomegalia (seta), presença de líquido serosanguinolento em celoma (cabeça de seta). (E) Congestão esplênica e esplenomegalia (seta), presença de líquido serosanguinolento em celoma (cabeça de seta). (F) Enterorragia (seta branca). Barras: 1 cm.13
- Figura 3 – Frequência do isolamento de *Aeromonas hydrophila* nos tecidos de *Piaractus mesopotamicus*. As colunas verticais expressam os percentuais de isolamento positivo para *A. hydrophila* presente nos tecidos de *P. mesopotamicus* (n=10) em diferentes tempos de infecção (hpi=horas pós-inoculação).14
- Figura 4 – População bacteriana nos órgãos e sangue de *Piaractus mesopotamicus* infectados por *Aeromonas hydrophila*. As colunas verticais dos gráficos representam a população bacteriana em log de unidades formadoras de colônia (UFC) por g/mL de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n=10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Dunn (5%).16
- Figura 5 – Fotomicrografias de coração e baço de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Tecido cardíaco normal. (B) Necrose de cardiomiócitos ventriculares e infiltrado leucocitário (asterisco). (C) Colônias bacterianas aderidas ao pericárdio e presença de infiltrados circundando essas áreas (seta). (D) Tecido esplênico normal. (E) Congestão de vasos do baço (setas). (F) Colônias bacterianas aderidas à cápsula esplênica (asterisco) e presença de infiltrado leucocitário (setas). Coloração de HE, barras A-F: 20 µm.18
- Figura 6 – Fotomicrografias de pâncreas de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Tecido pancreático normal. (B) Congestão de grandes vasos (asterisco). (C) Áreas de necrose (asteriscos) com vaso dilatado e presença de leucócitos em seu interior

e tecido circunjacente (setas). (D) Colônia bacteriana (seta) e área de necrose adjacente (asterisco). Coloração HE, barras A-C: 20 µm e barra D: 10 µm.19

Figura 7 – Fotomicrografias de rim e encéfalo de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Túbulos renais normais. (B) Melanomacrófagos no interstício dos túbulos renais (setas). (C) Hemorragia intersticial em tecido renal (asterisco). (D) Necrose com núcleos em cariólise (setas) e perda da delimitação citoplasmática entre as células epiteliais dos túbulos renais (asterisco). (E) Capilar de tecido nervoso sem congestão (seta). (F) Discreta congestão capilar em tecido nervoso (seta). Coloração HE, barras A e D: 10 µm e barras B, C, E e F: 20 µm... ..20

Figura 8 – Fotomicrografias de fígado de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Tecido hepático normal. (B) Congestão de capilares sinusóides (setas). (C) Hemorragia (asterisco). (D) Morte celular e desorganização da arquitetura do tecido hepático em região perivascular (setas). (E) Cápsula hepática normal (seta). (F) Colônias bacterianas aderidas à cápsula hepática (seta) com infiltrado leucocitário e necrose dos hepatócitos (asterisco). Coloração HE, barras A e B: 20 µm, barra C: 50 µm, barra D: 100 µm e barras E e F: 10 µm.....22

Figura 9 – Fotomicrografias de brânquia e intestino de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Filamentos branquiais e lamelas secundárias normais. (B) Destacamento de células epiteliais da base das lamelas que se apresentam adelgaçadas (setas) e congestão de grande vaso (asterisco). (C) Congestão de lamelas secundárias (setas). (D) Edema de lamelas secundárias (seta). (E) Vilosidades e mucosa intestinal normais (seta). (F) Necrose das vilosidades e mucosa intestinal (seta). Coloração HE, barras A-C: 20 µm, barra D: 50 µm e barras E e F: 200 µm.24

Figura 10 – Eletromicrografias de células de baço de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Núcleo normal (N). (B) Núcleo em cariólise (N). (C) Núcleo picnótico (N). (D) Núcleo em cariorrexe (N). Barras: 1 µm.26

Figura 11 – Eletromicrografias de rim e coração de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Célula de túbulo renal apresentando mitocôndrias (MT), retículos endoplasmáticos (RE) e núcleo (N) normais. (B) Célula de túbulo renal com perda da integridade das membranas e dissolução de mitocôndrias (MT) e retículos endoplasmáticos (RE). (C) Retículo endoplasmático (RE) com ribossomos aderidos (setas) de cardiomiócitos normais. (D) Dilatação e destacamento de ribossomos (setas) dos retículos endoplasmáticos (RE) de cardiomiócitos alterados. Barras: 1 µm.27

- Figura 12 – Eletromicrografia do rim de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila* evidenciando uma célula renal na porção superior direita da imagem, com núcleo (N), membrana nuclear (MN) e retículos endoplasmáticos (RE) normais. Separada pela membrana citoplasmática (MC), outra célula situada na porção inferior esquerda da imagem, apresenta edema de retículo endoplasmático (RE-E), membrana nuclear (MN-E) e mitocôndrias (MT-E), barra: 1 μm28
- Figura 13 – Eletromicrografia de fígado de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila* revelando a presença das bactérias (setas) associadas uma célula morta ou em processo de morte (CM), ao seu lado pode se visualizar o citoplasma de uma célula viva (CV), barra: 1 μm29
- Figura 14 – Curva de mortalidade de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila* (n=28), grupo desafio, e injetados com salina (0,65%) estéril, grupo controle (n=28), durante o período total de observação de cinco dias (120 horas)30

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas cinco décadas a produção mundial de peixes cresceu o dobro do crescimento populacional, aumentando também como o consumo mundial *per capita* de peixe, o qual passou de 9,9 kg em 1960 para 20,1 kg em 2014 (FAO, 2016). No Brasil, o pacu faz parte das seis espécies ou grupos de peixes mais criados em águas continentais, que juntos representaram 92 % da produção nacional de piscicultura no ano de 2015 (IBGE, 2015).

O crescimento e a intensificação da produção de peixes favorecem o aumento da incidência e severidade de doenças, principalmente as infecciosas de origem bacteriana, como a aeromonose causada por *Aeromonas* spp., que tem grande significado em criações intensivas por suas altas taxas de mortalidade (MORAES; MARTINS, 2004).

Dentre as *Aeromonas* móveis, as cepas de *A. hydrophila* são consideradas as mais virulentas para teleósteos (CYRINO et al., 2004; HOLLIMAN, 1993;), além de ser zoonose que provoca diarreia e septicemia em humanos (BORCHARDT; STEMPER; STANDRIDGE, 2003; DEODHAR; SARASWATHI; VARUDKAR, 1991). Em peixes, a infecção por *Aeromonas* spp. causa ruptura de pequenos vasos sanguíneos provocando hemorragias cutâneas e nas nadadeiras, progredindo para ulcerações com perda de epitélio, anemia, anorexia, letargia, sepsse hemorrágica e morte (BOIJINK; BRANDÃO, 2001; DUNG et al., 2008; WOO; BRUNO, 2003).

Os efeitos deletérios causados por bactérias Gram negativas como *A. hydrophila* são consequência da liberação de endotoxinas que desencadeiam a sepsse ou endotoxemia, síndromes complexas definidas pela presença de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (CLAUDIANO, 2015; RAU et al., 2007). A consequência desta resposta inflamatória exacerbada e descontrolada é a evolução do quadro para síndrome da insuficiência múltipla dos órgãos, que é acompanhada de alta mortalidade (SALLES et al., 1999).

Altas taxas de mortalidade e lesões hemorrágicas internas pronunciadas são manifestações comuns nas formas superaguda e aguda da aeromonose causada por *A. hydrophila* em peixes (MCDANIEL, 1979). Carnevia et al. (2010) identificaram em peixes ornamentais *A. hydrophila* e *Pseudomonas fluorescens* como os

principais agentes da septicemia hemorrágica bacteriana, sendo a manifestação aguda da doença a mais prevalente.

Reforçando a importância das manifestações clínicas da fase aguda da aeromonose septicêmica, Claudiano (2015) observou, em um estudo de infecção experimental com *A. hydrophila* em pacus, que o início da mortalidade ocorreu 9 horas após a inoculação celomática da suspensão bacteriana. Da mesma forma, Carriero et al. (2016) relataram as primeiras mortes de pacus depois de 8 horas do desafio com *Aeromonas dhakensis*, antiga *A. hydrophila* subespécie *dhakensis*.

Deste modo, o presente trabalho visou caracterizar por meio de estudos morfológicos e microbiológicos a fase aguda do processo séptico em diferentes tecidos de pacus infectados experimentalmente com *A. hydrophila*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piscicultura

A produção de peixes tem apresentado considerável crescimento mundial, aumentando a uma taxa média anual de 3,2 % no período de 1961 a 2013. O Brasil alcançou em 2014 a oitava posição no *ranking* mundial dos 25 maiores produtores de peixes de águas continentais, sendo que a soma da produção desses oito países equivaleu a 91,81% da produção mundial em pisciculturas continentais (FAO, 2016).

Em 2015, a produção nacional de peixes foi de 482,24 mil toneladas, representando um incremento de 1,5% em relação à produção do ano anterior. As regiões Norte, Sudeste e Sul obtiveram aumento de produção, enquanto Nordeste e Centro-Oeste tiveram queda em relação a 2014, sendo os cinco maiores produtores de peixes em 2015 os estados de Rondônia, Paraná, Mato Grosso, São Paulo e Ceará, respectivamente (IBGE, 2015).

Dentre os peixes mais criados em águas continentais, as tilápias e os peixes redondos (pacu, tambaqui, tambacu, patinga, tambatinga e pirapitinga) são os de maior importância, pois juntos somaram 409,38 mil toneladas ou 84,6% da produção nacional de piscicultura no ano de 2015 (IBGE, 2015).

O pacu é encontrado naturalmente nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, comercialmente falando em seu grupo incluem-se os peixes de maior valor para pesca e piscicultura brasileiras. Esta espécie apresenta grande potencial para a

piscicultura intensiva devido à adaptabilidade ao cultivo e menor exigência de proteína (BOSCOLO et al., 2010).

2.2 *Aeromonose*

As bactérias do gênero *Aeromonas* são agentes comuns na piscicultura tropical, consideradas cosmopolitas, podendo ser encontradas em fontes naturais de água, no solo, em animais de água doce e crescendo em temperaturas que variam de 5°C a 37°C (DAVIS et al., 1990; KOZINSKA, 2007). Tratam-se de microrganismos Gram negativos, não encapsulados, com respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa, têm forma de bastonete móvel, possuem flagelos polares e não produzem esporos (STOSKOPF, 1993; KOZINSKA, 2007).

Dentre as principais características bioquímicas destas bactérias destacam-se as reações positivas em testes de oxidase e catalase; utilização da D-glicose como única fonte de carbono e energia; utilização de sais amoniacais como fonte de nitrogênio; redução de nitrato a nitrito (por meio da desnitrificação) e resistência ao agente vibriostático 2,4- diamino-6,7-diisopropilpteridine (O/129) (JANDA; ABOTT, 2010).

Por serem Gram negativos, possuem lipopolissacarídeos (LPS), os quais são descritos como potentes agentes quimiotáticos de leucócitos e indutores do choque séptico tanto em mamíferos como em peixes (FREUNDENBERG et al., 1984, NAYAK et al., 2008).

As *Aeromonas* spp. fazem parte da microbiota intestinal de peixes saudáveis, sendo que sua presença não indica que o animal esteja doente (TRUST et al., 1974). Entretanto, o estresse gerado por alterações na qualidade da água e nas práticas de manejo na piscicultura intensiva é fator predisponente para surtos infecciosos por essa bactéria (CIPRIANO, 2001; MORAES; MORAES, 2009; YOGANANTH et al., 2009).

Os principais fatores de virulência das cepas de *A. hydrophila* estão relacionados à produção de enzimas extracelulares e toxinas por esses agentes, como proteases, citosinas, elastases, amilases, nucleases, lipases e hemolisinas, que estão vinculadas aos sinais clínicos de aeromonose (KOZINSKA, 2007; KOZINSKA; PEKALA, 2010; OROZOVA et al., 2008).

De acordo com McDaniel (1979), a aeromonose causada por *A. hydrophila* pode ocorrer na forma superaguda, aguda, subaguda e crônica. As formas superaguda e aguda são caracterizadas pelas lesões hemorrágicas internas pronunciadas e taxa alta mortalidade. As formas subaguda e crônica ocorrem com hemorragias nas brânquias, aberturas naturais, órgãos internos e presença de líquido sanguinolento nas cavidades do corpo; além de abscessos e úlceras externas.

2.3 Processo séptico

A multiplicação e consequente liberação de endotoxinas ou LPS por bactérias Gram negativas, como *A. hydrophila*, desencadeia o processo séptico ou endotoxemia, que pode levar à mortalidade do homem e de animais (RAU et al., 2007). A propriedade endotóxica dos LPS está relacionada à liberação de sua fração denominada lipídeo A, que é oriunda da lise das bactérias e promove a grande reação inflamatória conhecida como choque séptico (TOMÁS, 2012).

Acredita-se que o início e progressão da sepse ocorram devido à maciça e descontrolada ativação de células inflamatórias, resultando numa anarquia metabólica, na qual “o próprio organismo não consegue controlar o que ele próprio criou” (BONE, 1991). Assim, a sepse é uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica, que tem como fator etiológico uma infecção (KNOBEL, 2006).

O processo séptico tem sua origem a partir do contato do organismo com componentes microbianos que ativam o sistema de defesa, o qual, por sua vez é responsável pela liberação de mediadores inflamatórios (MADDEN et al., 1989; NDUKA; PARRILLO, 2011). Nesse sentido, citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-8 são inicialmente produzidas no sítio de infecção, favorecendo a migração e ativação das células do sistema de defesa (FRACASSO, 2008).

As consequências desta resposta inflamatória exacerbada e descontrolada são o comprometimento de muitos órgãos e o quadro evolui para o choque e a síndrome da insuficiência múltipla dos órgãos, que é acompanhada de alta mortalidade (SALLES, et al., 1999). A identificação e elucidação dos processos fisiopatológicos da resposta inflamatória sistêmica são fundamentais porque ela tem participação na perda da homeostase orgânica e consequentemente nos eventos

que culminam com o choque séptico e a hipotensão causadora da morte decorrente do colapso cardíaco (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

2.4 Aspectos morfológicos de doenças de peixes

O diagnóstico de doenças de peixes geralmente é estabelecido por sinais clínicos e demonstração da presença dos patógenos nas lesões. Os sinais clínicos e alterações histopatológicas fornecem vantagens para o diagnóstico das doenças bacterianas de peixes, porém para um diagnóstico preciso são necessárias técnicas microbiológicas para o isolamento e identificação dos agentes patogênicos (KARUNASAGAR; KARUNASAGAR, 1999).

Ademais, a análise histopatológica dos órgãos permite detectar sinais das doenças que não são facilmente identificados no exame macroscópico, auxiliando assim na manutenção da saúde dos peixes (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009).

Em estudos histopatológicos de fígado de bijupirás jovens que apresentaram altas taxas de mortalidade, baixa taxa de crescimento, letargia, úlceras em nadadeiras, despigmentação de pele, deformidades físicas e parasitas externos permitiram o diagnóstico de esteatose hepática que estava relacionada ao tipo de alimentação fornecida, o que favoreceu a infecção bacteriana por *Photobacterium damsela* e parasitismo (SHIMADA et al., 2014).

Da mesma forma, Fogelson et al. (2016) utilizaram a histopatologia associada a ensaios microbiológicos e moleculares para caracterizar e identificar a bacteriose por *Edwardsiella piscicida* como causadora de necrose em múltiplos órgãos, formação de granulomas e mortalidade crônica em achigãs (*Micropterus salmoides*) de pisciculturas da Flórida e Nova Iorque.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é também utilizada no estudo de material biológico, pois permite a definição ultraestrutural de imagens intracelulares, possibilitando estudos de morfologia celular, aspectos gerais das organelas e também da interação de parasitos com as células. Além de fornecer informações sobre alterações e efeitos citopáticos ocasionados por vírus, micoplasmas, bactérias e outros microrganismos que não são visualizados na histopatologia por meio da microscopia de luz (GALLETI, 2003).

A literatura relata vários estudos que buscaram compreender os mecanismos de infecção por meio da MET, evidenciando os locais de infecção, a visualização de patógenos no interior de células infectadas, lesões causadas pelo agente agressor e confirmação da associação da doença ao patógeno suspeito, tanto em mamíferos (ANDRADE et al., 2010; BARBOSA et al., 2000; BRICEÑO et al., 2006, BRICEÑO et al., 2008; VELANDIA et al., 2007; VILELA; BENCHIMOL, 2012) quanto em peixes (BAKKEMO et al., 2011; BRUDAL et al., 2015; FEHR et al., 2015; HOSSEINI et al., 2014; NGUYEN-CHI et al., 2014; VALIENTI et al., 2008).

3 OBJETIVO

O presente estudo visou caracterizar por meio de estudos microbiológicos e morfológicos a fase aguda do processo séptico em diferentes tecidos de pacus infectados experimentalmente com *A. hydrophila*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Peixes e condições de manutenção

Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo nº 01471/15, o experimento foi conduzido no Biotério de Experimentação em Ictiopatologia “Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes” do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (Cppar), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus de Jaboticabal, SP. Foram utilizados 160 pacus, *Piaractus mesopotamicus*, provenientes da mesma desova e peso médio de $250 \pm 99,3$ g, que foram mantidos em caixas de fibra de 250 L (n=10), abastecidas com água corrente de poço artesiano em fluxo contínuo, com vazão de 1 L/min e com aeração suplementar. Os peixes foram alimentados com ração comercial peletizada (28% PB e 4000 kcal/kg⁻¹EB) duas vezes ao dia *ad libitum*. As caixas foram sifonadas uma vez por semana e a qualidade da água determinada diariamente com oxímetro YSI®, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pelo YSI®, modelo 63, permanecendo na faixa adequada ao conforto da espécie (valores obtidos: oxigênio dissolvido= 5,1 mg/L; temperatura= 29,47 °C; pH= 7,66 e

condutividade elétrica = 117,96 $\mu\text{S/cm}$) (BOYD, 1990; SIPAÚBA-TAVARES; MORENO, 1994).

4.2 Cepas bacterianas

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados que apresentavam lesões compatíveis com aeromonose (GARCIA; MORAES, 2009). A identificação inicial das colônias bacterianas foi realizada segundo Popoff (1984) e Abeyta Júnior et al. (1990), acrescida de provas bioquímicas realizadas por *kit* comercial Bactray (Bactray 3 - Laborclin®), segundo as normas do fabricante. Para a caracterização genética a massa bacteriana oriunda do cultivo de colônias puras passou pelo processo de extração do DNA, segundo metodologia do fabricante (“Genomic DNA purification *kit* -Wizard®”). Após a obtenção do DNA, a amplificação do gene 16 S RNA ribossômico foi realizada de acordo com Sarkar, Saha e Roy (2012) e as sequências analisadas pelo algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) apresentaram 99 % de similaridade com *A. hydrophila*. Essas análises moleculares foram realizadas no Departamento de Tecnologia, FCAV, Unesp/Jaboticabal, SP.

A certificação da patogenicidade desta cepa de *A. hydrophila* foi realizada por meio de três passagens sucessivas em seis pacus, dois por passagem e reisolamento, que foram inoculados com 1,0 mL de suspensão bacteriana ($2,4 \times 10^9$ UFC/mL, correspondente ao tubo 8 da escala de McFarland) pela via celomática. Após a terceira passagem, a bactéria isolada dos tecidos dos peixes passou pelos mesmos testes de confirmação microbiológica e molecular descritos acima.

4.3 Determinação da dose letal de 50 % (DL50%)

A determinação da dose letal de 50% (DL50%) dos peixes, no período de 50 a 96 horas, foram utilizados 48 pacus (*P. mesopotamicus*), distribuídos em seis caixas d'água de 250 L (n=8/caixa), em delineamento inteiramente casualizado, para assim determinar a concentração bacteriana usada como inóculo. Os pacus de cinco caixas d'água foram submetidos à inoculação com 0,5 mL de concentrações crescentes de *A. hydrophila*, correspondentes aos tubos de 5 a 9 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^9$; $1,8 \times 10^9$; $2,1 \times 10^9$; $2,4 \times 10^9$; $2,7 \times 10^9$ células bacterianas por

mL), por via celomática. Os animais do grupo controle (n=8) receberam 0,5 mL de salina (0,65%) estéril pela mesma via.

Durante o período de exposição (96h), os peixes foram mantidos sem alimentação e sem sifonagem da água, com monitoramento diário das variáveis físico-químicas e da taxa de mortalidade. Os valores da DL50% 50-96h foram calculados pelo método “trimmed sperman Karber”, obtendo a DL50% estimada em $1,78 \times 10^9$ e com o limite inferior e superior em $1,64 \times 10^9$ e $2,3 \times 10^9$, respectivamente.

4.4 Delineamento experimental e indução da sepse

Após a realização de ensaios preliminares que foram determinantes para o delineamento experimental, os peixes foram distribuídos inteiramente ao acaso em cinco grupos de acordo com o tempo em horas pós-inoculação (hpi): grupo controle ou 0 hpi (n=10), grupo 1 hpi (n=10), grupo 3 hpi (n=10), grupo 6 hpi (n=10) e grupo 9 hpi (n=10). Os dez peixes do grupo controle foram injetados pela via celomática com 0,5 mL de salina (0,65 %) esterilizada. Os peixes dos demais grupos foram inoculados com *A. hydrophila* ($1,78 \times 10^9$ UFC/mL), veiculada em 0,5 mL de salina (0,65%) esterilizada, correspondente à dose letal de 50 % (DL50%). Antes dos procedimentos todos os grupos de peixes foram submetidos à anestesia em banho de solução aquosa de benzocaína (1,0 g/10 mL), diluída em álcool 98° (0,1 g/mL) (WEDEMEYER; ROSS; SMITH, 1970), segundo a escala de Ross e Ross (2008).

4.5 Coleta do material biológico

Transcorridos os tempos pré-determinados de 0, 1, 3, 6 e 9 hpi, os pacus de cada grupo foram novamente anestesiados (WEDEMEYER; ROSS; SMITH, 1970) para coleta de amostras de sangue por punção do vaso caudal com agulhas (25 mm x 7 mm) e seringas (3,0 mL) estéreis. O sangue foi destinado aos exames microbiológicos do sangue fresco.

Após as coletas de sangue os peixes foram submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico (banho em solução aquosa de benzocaína 1:20000), diluída em álcool 98° (0,1 g/mL) (WEDEMEYER; ROSS; SMITH, 1970). Foram coletados assepticamente fragmentos de baço, coração, encéfalo, fígado e rim para realização dos exames microbiológicos, histopatológico e ultraestrutural.

Adicionalmente, foram também coletados intestino, brânquias e pâncreas para o exame histopatológico.

4.6 Exame clínico e alterações macroscópicas

Os animais foram avaliados durante todo o experimento para a verificação de possíveis alterações macroscópicas e/ou de comportamento clínico.

4.7 Exames microbiológicos

Para determinação da frequência de isolamento de *A. hydrophila* nos diferentes tempos pós-inoculação, um fragmento de cada órgão coletado assepticamente e sangue fresco foram semeados com alça de platina na superfície das placas de TSA, acrescidas de 10 mg/L de ampicilina sódica, e incubadas por 24 horas, a 28 °C, em aerofilia (NIELSEN et al., 2001).

Outro fragmento dos órgãos destinou-se à caracterização da população bacteriana. Para tanto esses fragmentos foram pesados em microtubos esterilizados (Eppendorf®), onde foram triturados em tampão fosfato salino (0,1 M e pH 7,0) na proporção de 1:10 e diluídos serialmente até 10^{-4} . Por meio do método “Spread-plate”, 50 µL de cada diluição seriada e do sangue fresco foram semeados em ágar tríptico de soja (TSA), acrescido de 10 mg/L de ampicilina sódica. O material foi incubado por 24 horas, a 28 °C, em aerofilia. A seguir foi realizada a contagem das colônias em contador eletrônico (CP 600 Plus - Phoenix®) (CERESER et al., 2013).

Após o crescimento bacteriano foram isoladas colônias de todos os grupos experimentais, de forma amostral, para confirmação da espécie bacteriana por meio das mesmas provas realizadas no item 4.2.

4.8 Exame histopatológico

As amostras dos órgãos destinados ao estudo histopatológico foram fixadas em formaldeído 10% tamponado por 24 horas, e então conservado em álcool 70% até a inclusão em parafina histológica. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes seriados de 5 µm e corados por hematoxilina e eosina (HE), seguindo-se os padrões de rotina pré-estipulados (LUNA, 1968).

4.9 Exame ultraestrutural

Os fragmentos de tecidos destinados aos estudos de microscopia eletrônica de transmissão foram fixados em solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído / 2% de formaldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4) por 24 horas a 4° C. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M, três vezes, para então serem submetidas à pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato por 1 hora. Os procedimentos subsequentes foram realizados no Setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular Biopatogênico, USP/Ribeirão Preto-SP, de acordo com Souza et al. (2001). As imagens foram obtidas por câmeras ligadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL-100CXII.

4.10 Mortalidade

Para avaliação da mortalidade foram utilizados 56 pacus, distribuídos em dois grupos (n=28), sendo que um grupo foi inoculado com 0,5 mL de suspensão de *A. hydrophila* ($1,78 \times 10^9$ UFC), e o outro injetado com 0,5 mL de salina (0,65%) estéril, servindo como grupo controle. A determinação foi feita pela constatação da mortalidade dos animais durante o período de infecção, ou seja, após a indução da sepse. Foi estabelecido o prazo máximo de observação de cinco dias (120 horas) para o levantamento dos dados da mortalidade acumulada nesse período.

4.11 Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância em delineamento inteiramente casualizado e ao teste de normalidade alfa 5% (Kolmogorov – Smirnov; Anderson-Darling; Shapiro-Wilk e Watson). Estabelecida a normalidade dos dados foi realizada comparação das médias obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou teste Dunn's (5%) utilizando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

5 RESULTADOS

5.1 Exame clínico e alterações macroscópicas

Não foram observadas alterações de comportamento em nenhum dos grupos infectados ou mesmo controle. Os achados macroscópicos observados durante as

necropsias foram evidentes somente 6 e 9 hpi, sendo o último caracterizado por maior severidade das lesões.

À inspeção externa foram observadas hemorragias cutâneas petequiais, principalmente próximas ao local da inoculação (Figura 1-B), em nadadeiras e opérculos (Figura 1-C); congestão branquial (Figura 1-E) e presença de sangue na câmara anterior do globo ocular (hifema) (Figura 1-F). As principais alterações identificadas em cavidades foram hemorragia petequial em parede celomática e serosa dos órgãos (Figura 2-B); congestão de vasos da parede celomática (Figura 2-B); presença de líquido serosanguinolento em celoma (Figura 2- B, D e E); congestão hepática e hepatomegalia (Figura 2-D); congestão esplênica e esplenomegalia (Figura 2-E); enterorragia (Figura 2-F).

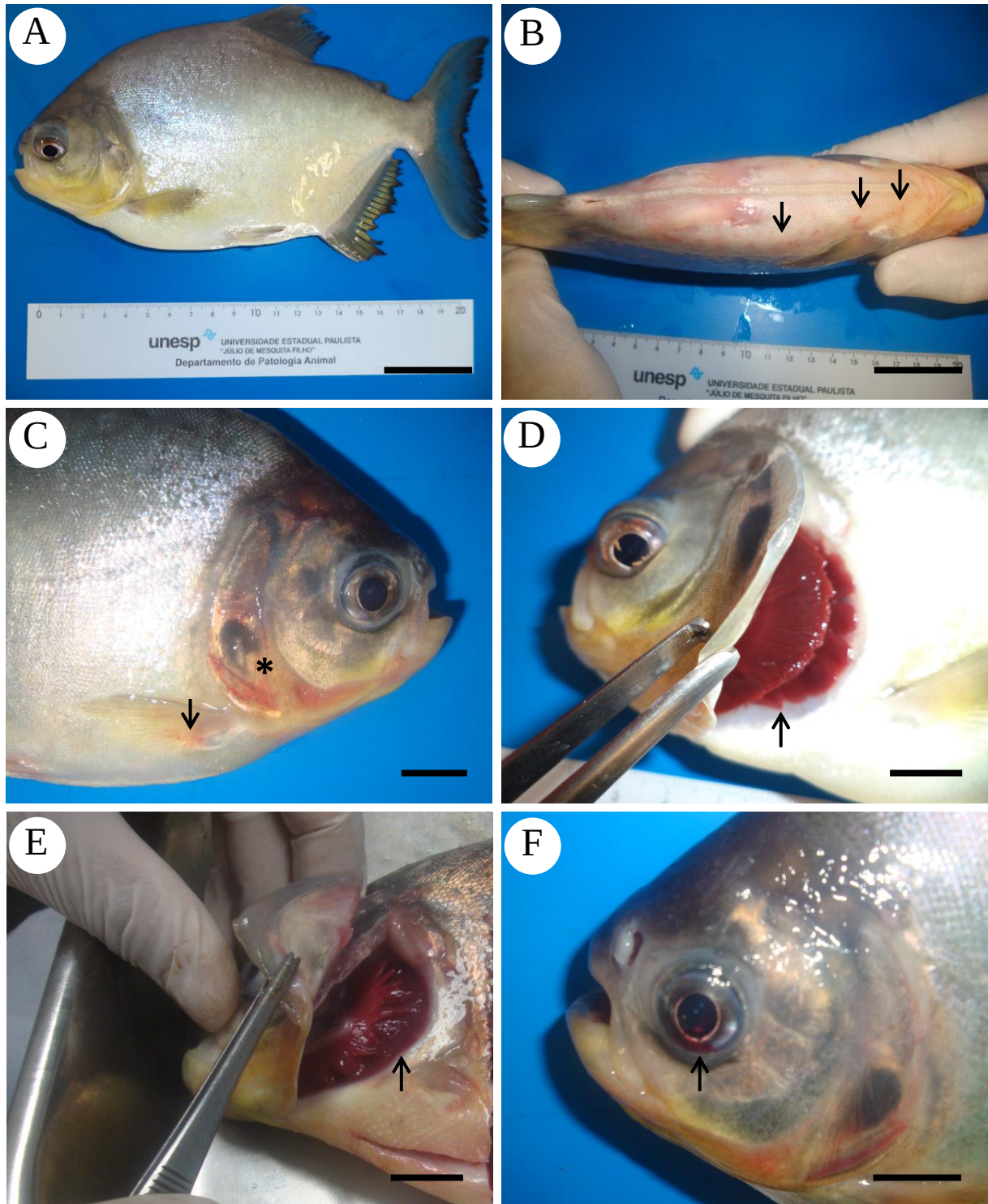


Figura 1 – Alterações macroscópicas de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Peixe controle (sem alterações externas). (B) Hemorragia cutânea (setas). (C) Hemorragia em nadadeiras (seta) e em opérculo (asterisco). (D) Brânquias normais (seta). (E) Congestão branquial (seta). (F) Hifema (seta). Barras A e B: 4 cm e barras C-F: 1 cm.

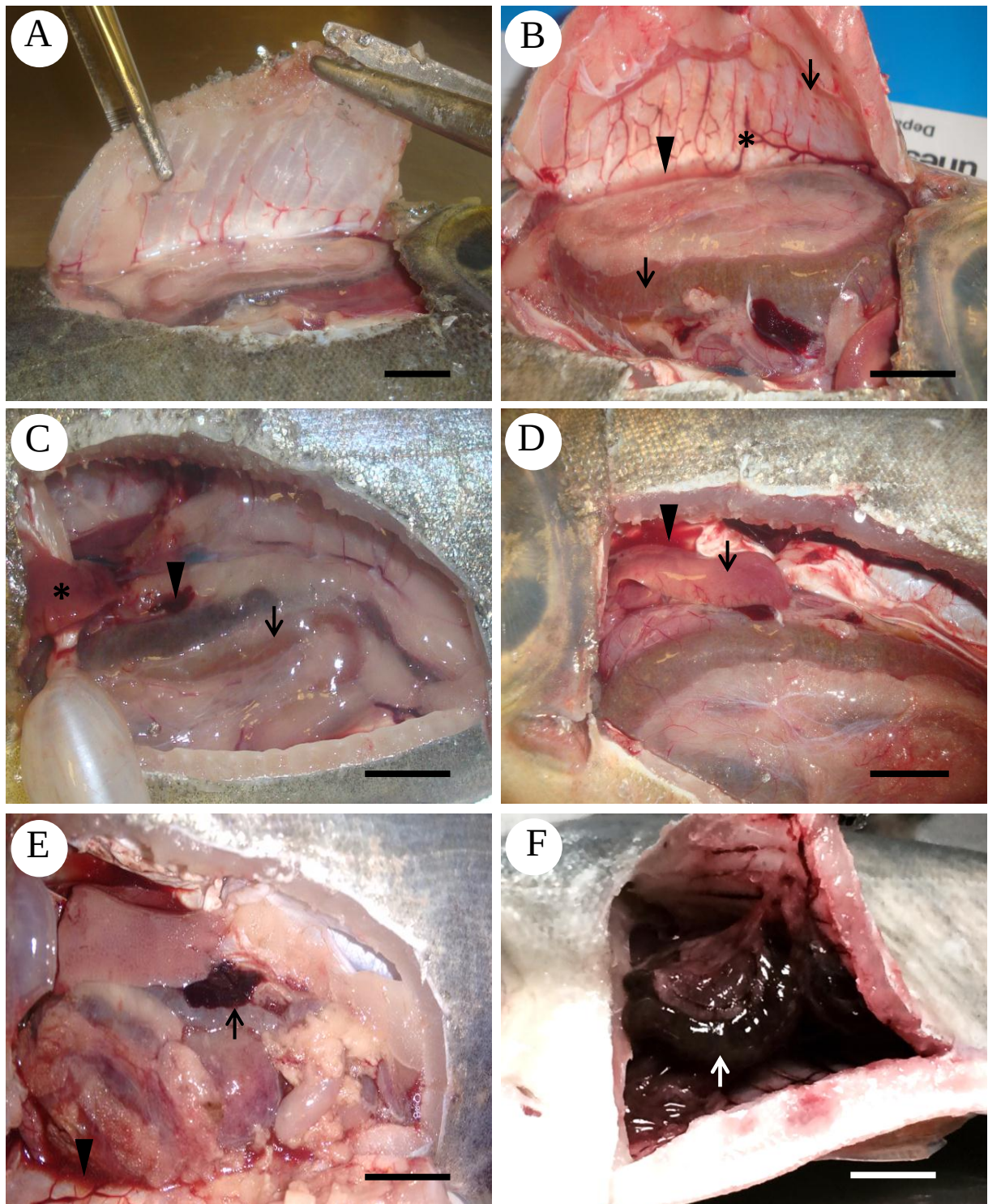


Figura 2 – Alterações macroscópicas de *Piarractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Parede celomática normal. (B) Hemorragia petequial em parede celomática e serosa dos órgãos (setas), congestão de vasos (asterisco) e presença de líquido serosanguinolento em celoma (cabeça de seta). (C) Fígado (asterisco), baço (cabeça de seta) e intestino (seta) normais. (D) Congestão hepática e hepatomegalia (seta), presença de líquido serosanguinolento em celoma (cabeça de seta). (E) Congestão esplênica e esplenomegalia (seta), presença de líquido serosanguinolento em celoma (cabeça de seta). (F) Enterorrágia (seta branca). Barras: 1 cm.

5.2 Exames microbiológicos

Os resultados da frequência de isolamento foram expressos na forma de percentagem, caracterizados pelo isolamento de colônias puras de *A. hydrophila* a partir dos diferentes órgãos e sangue transcorridos os tempos experimentais pré-estabelecidos. Os dados mostraram que somente a partir das 9 hpi, 100 % dos animais infectados com a bactéria, foram obtidos resultados positivos para o reisolamento de *A. hydrophila* em todos os tecidos semeados (Figura 3).

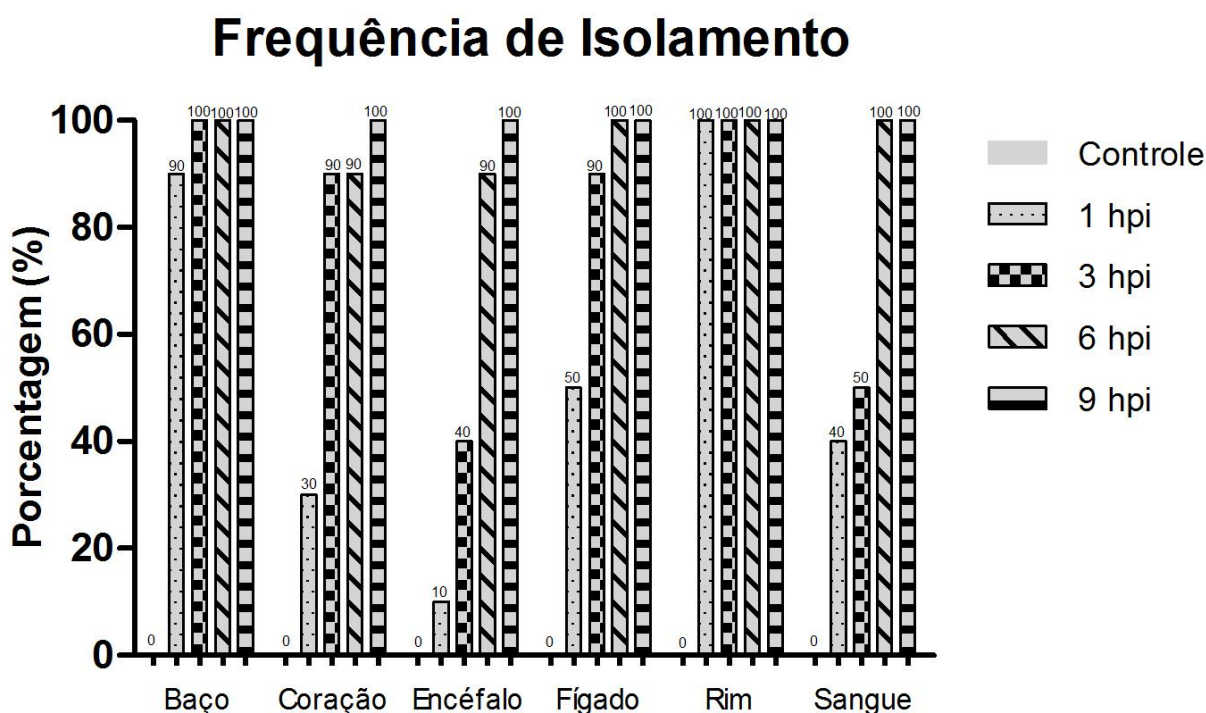


Figura 3 – Frequência do isolamento de *Aeromonas hydrophila* nos tecidos de *Piaractus mesopotamicus*. As colunas verticais expressam os percentuais de isolamento positivo para *A. hydrophila* presente nos tecidos de *P. mesopotamicus* (n=10) em diferentes tempos de infecção (hpi=horas pós-inoculação).

Houve crescimento bacteriano ascendente nos cultivos de amostras de todos os órgãos e sangue dos peixes infectados ao decorrer dos tempos. Somente os tempos de 6 e 9 hpi diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) do grupo controle em todos os órgãos e sangue examinados (Figura 4). Vale ressaltar que os tecidos que obtiveram as maiores quantificações de população bacteriana foram baço, rim e fígado.

Com base nas alterações macroscópicas e exames microbiológicos o presente experimento reproduziu fidedignamente os postulados de Koch, provando

que a cepa de *A. hydrophila* isolada de pacus enfermos foi capaz de induzir à aeromonose em pacus saudáveis, que apresentaram os sinais clínicos característicos da doença e apresentaram isolamento positivo desta cepa bacteriana nos tecidos acometidos desses animais.

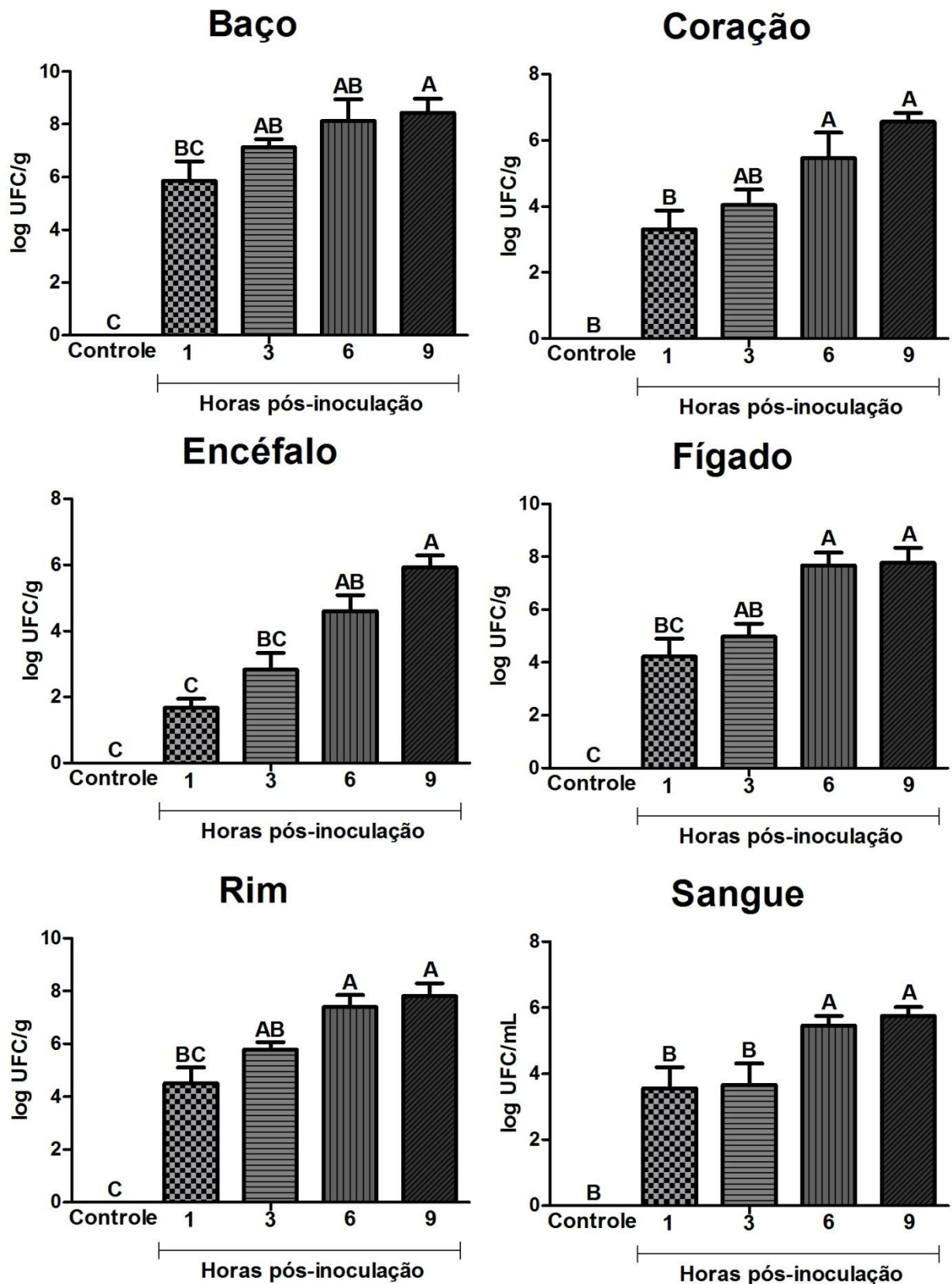


Figura 4 – População bacteriana nos órgãos e sangue de *Piaraactus mesopotamicus* infectados por *Aeromonas hydrophila*. As colunas verticais dos gráficos representam a população bacteriana em log de unidades formadoras de colônia (UFC) por g/mL de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n=10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Dunn (5%).

5.3 Exame histopatológico

De maneira geral, as lesões foram observadas 6 e 9 hpi em todos os órgãos e sangue avaliados, sendo mais frequentes e intensas em baço, fígado e rim.

No coração foram visualizadas colônias bacterianas aderidas ao pericárdio e presença de infiltrado leucocitário circundando essas áreas (Figura 5-C); discreta congestão de vasos do pericárdio; aglomerados de trombócitos entre o ventrículo e pericárdio; necrose de cardiomiócitos ventriculares e infiltrado leucocitário (Figura 5-B). O tecido esplênico apresentou extensas áreas de congestão (Figura 5-E), vacuolização citoplasmática e edema celular em região subcapsular do órgão. Também foram visualizadas colônias bacterianas aderidas à cápsula esplênica e presença de infiltrado leucocitário (Figura 5-F).

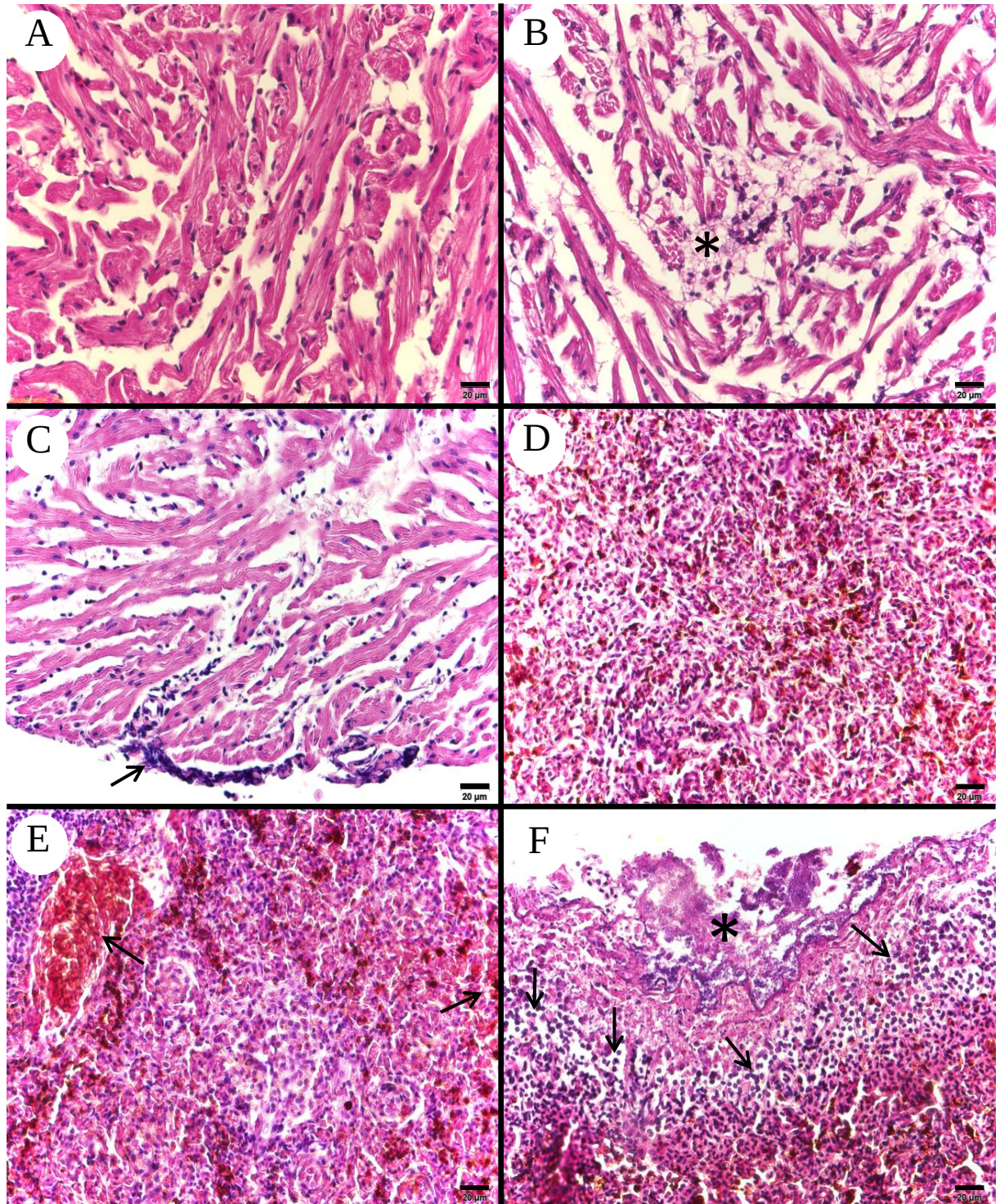


Figura 5 – Fotomicrografias de coração e baço de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila* col. (A) Tecido cardíaco normal. (B) Necrose de cardiomiócitos ventriculares e infiltrado leucocitário (asterisco). (C) Colônias bacterianas aderidas ao pericárdio e presença de infiltrados circundando essas áreas (seta). (D) Tecido esplênico normal. (E) Congestão de vasos do baço (setas). (F) Colônias bacterianas aderidas à cápsula esplênica (asterisco) e presença de infiltrado leucocitário (setas). Coloração HE, barras A-F: 20 µm.

O tecido pancreático foi encontrado no mesentério dos sacos pilóricos, em região capsular de baço e fígado. Nele foram observadas extensas áreas de morte celular com desorganização da arquitetura do tecido, sendo as principais alterações a congestão de grandes vasos (Figura 6-B), hemorragia, extensas áreas de necrose com infiltrado leucocitário (Figura 6-C) e presença de colônias bacterianas (Figura 6-D).

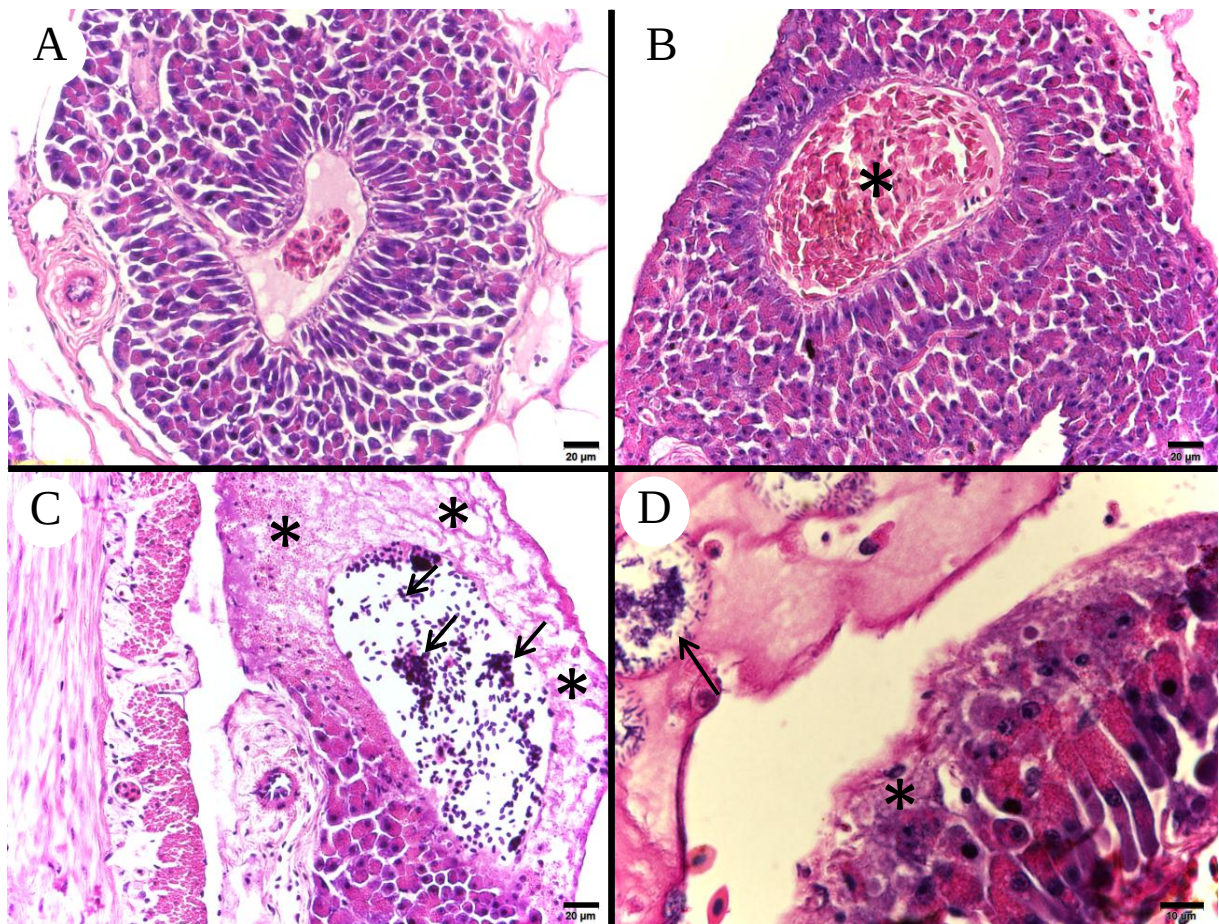


Figura 6 – Fotomicrografias de pâncreas de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Tecido pancreático normal. (B) Congestão de grandes vasos (asterisco). (C) Áreas de necrose (asteriscos) com vaso dilatado e presença de leucócitos em seu interior e tecido circunjacente (setas). (D) Colônia bacteriana (seta) e área de necrose adjacente (asterisco). Coloração HE, barras A-C: 20 μm e barra D: 10 μm

No rim foram encontradas maiores quantidades de melanomacrófagos (Figura 7-B), hemorragia (Figura 7-C), necrose com cariólise e perda da delimitação citoplasmática de células dos túbulos renais (Figura 7-D), congestão de grandes vasos e presença de colônias bacterianas circundadas por leucócitos. No encéfalo foram observadas congestões capilares discretas (Figura 7-F).

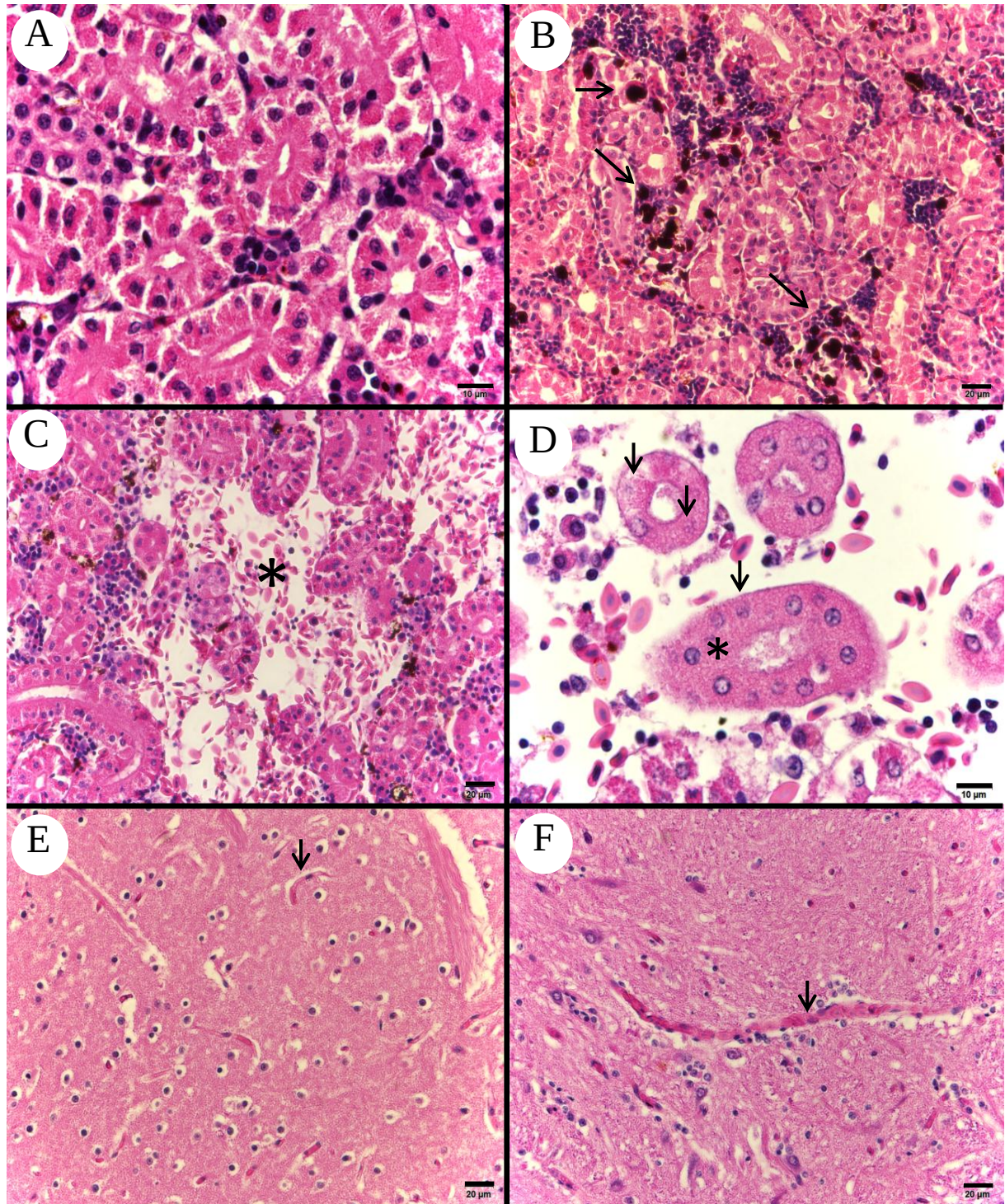


Figura 7 – Fotomicrografias de rim e encéfalo de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Túbulos renais normais. (B) Melanomacrófagos no interstício dos túbulos renais (setas). (C) Hemorragia intersticial em tecido renal (asterisco). (D) Necrose com núcleos em cariólise (setas) e perda da delimitação citoplasmática entre as células epiteliais dos túbulos renais (asterisco). (E) Capilar de tecido nervoso sem congestão (seta). (F) Discreta congestão capilar em tecido nervoso (seta). Coloração HE, barras A e D: 10 µm e barras B, C, E e F: 20 µm.

O fígado apresentou congestão de capilares sinusóides (Figura 8-B) e de grandes vasos; hemorragia (Figura 8-C); edema celular em hepatócitos; desorganização da arquitetura do tecido hepático, principalmente abaixo da cápsula e em regiões perivasculares (Figura 8-D); presença de colônias bacterianas aderidas à cápsula hepática com infiltrados leucocitários e necrose de hepatócitos (Figura 8-F).

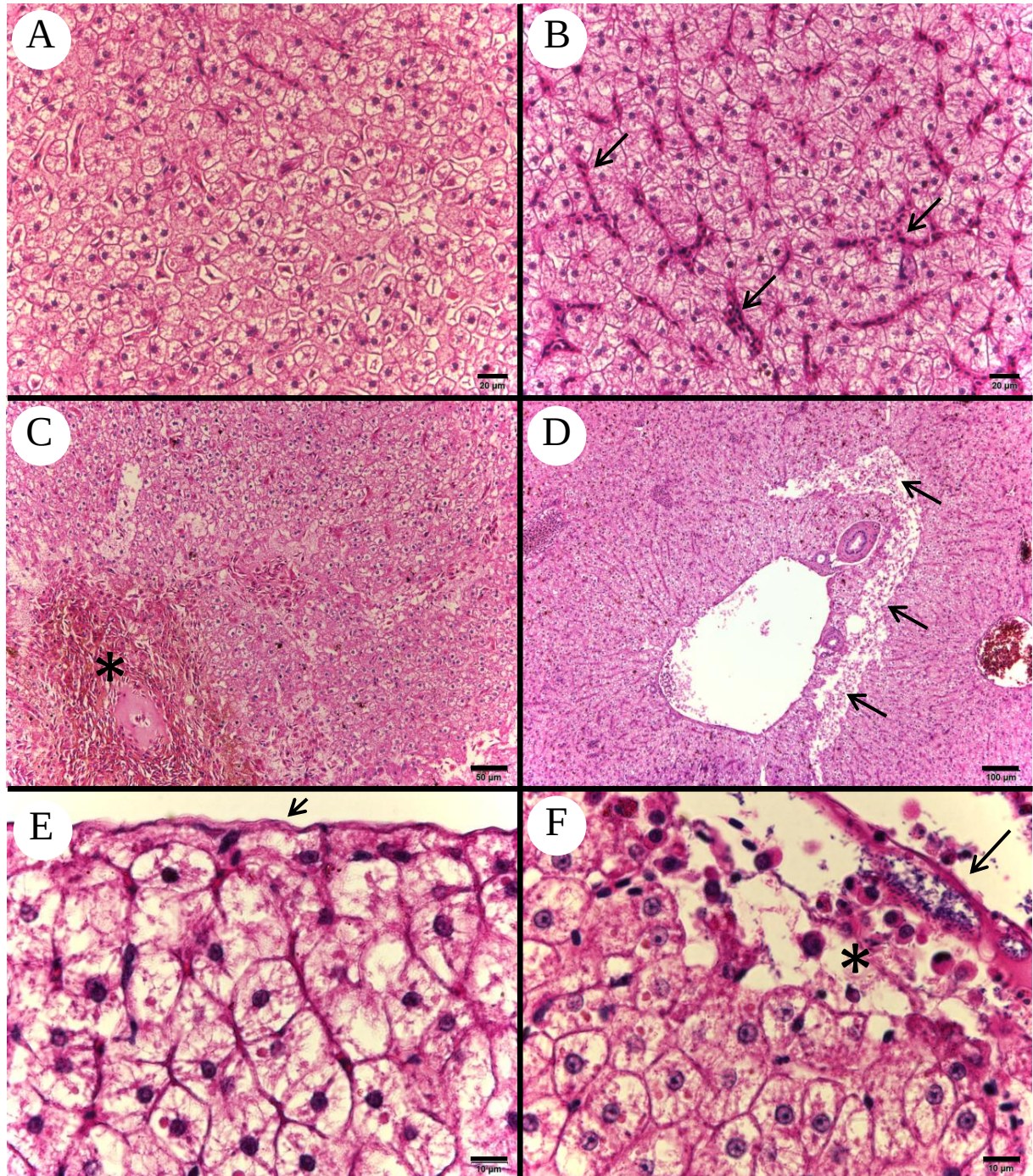


Figura 8 – Fotomicrografias de fígado de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Tecido hepático normal. (B) Congestão de capilares sinusóides (setas). (C) Hemorragia (asterisco). (D) Morte celular e desorganização da arquitetura do tecido hepático em região perivascular (setas). (E) Cápsula hepática normal (seta). (F) Colônias bacterianas aderidas à cápsula hepática (seta) com infiltrado leucocitário e necrose dos hepatócitos (asterisco). Coloração HE, barras A e B: 20 μ m, barra C: 50 μ m, barra D: 100 μ m e barras E e F: 10 μ m.

As brânquias dos peixes infectados apresentaram congestão de grandes vasos dos filamentos branquiais e extensas áreas de destacamento de células epiteliais da base das lamelas secundárias que se apresentaram adelgaçadas (Figura 9-B), além de congestão (Figura 9-C), hiperplasia interlamelar e edema subendotelial dessas lamelas (Figura 9-D). Os intestinos apresentaram necrose das vilosidades e mucosa intestinal (Figura 9-F) e presença de colônias bacterianas aderidas às camadas serosa e muscular.

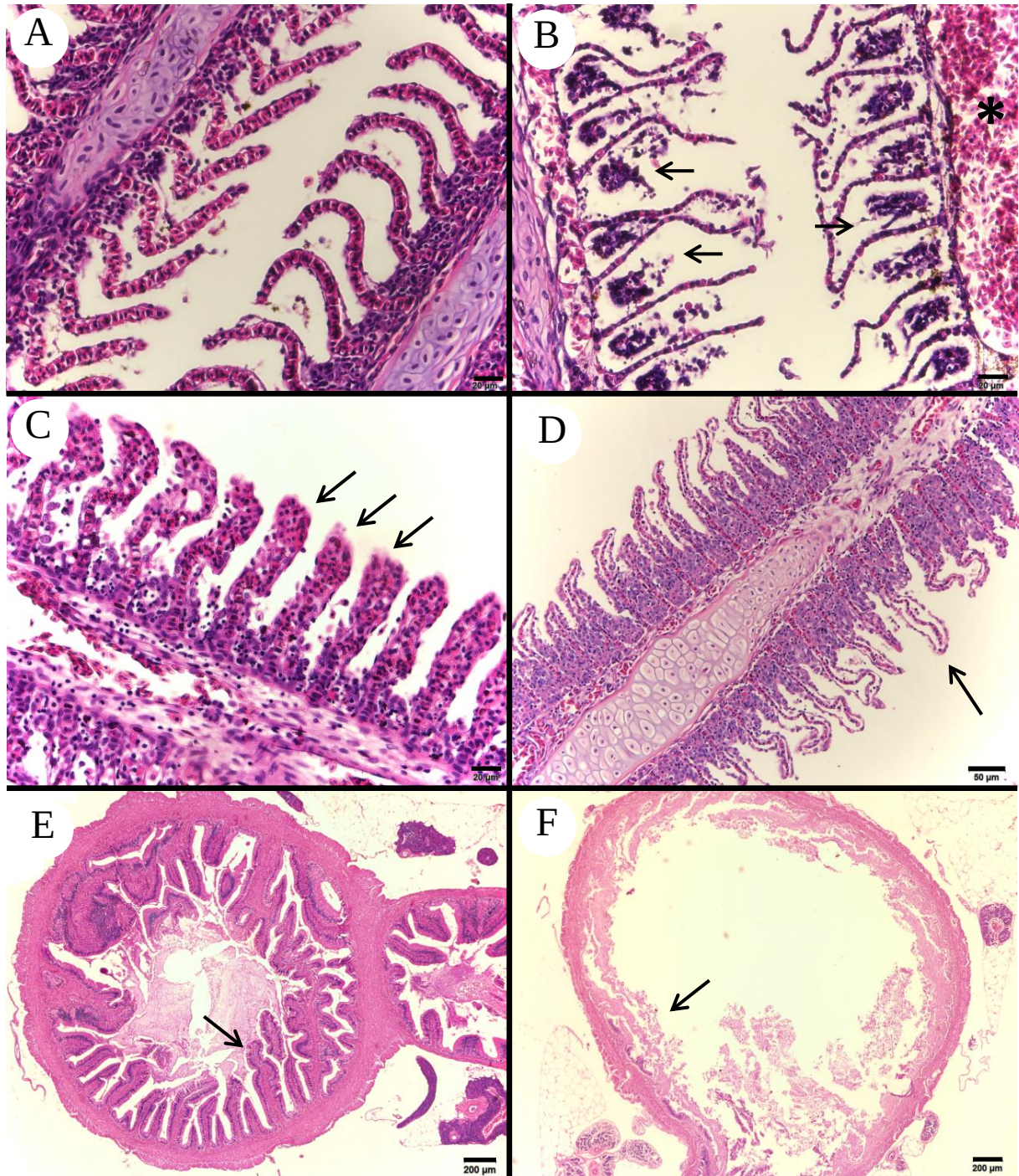


Figura 9 – Fotomicrografias de brânquia e intestino de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Filamentos branquiais e lamelas secundárias normais. (B) Destacamento de células epiteliais da base das lamelas que se apresentam adelgaçadas (setas) e congestão de grande vaso (asterisco). (C) Congestão de lamelas secundárias (setas). (D) Edema de lamelas secundárias (seta). (E) Vilosidades e mucosa intestinal normais (seta). (F) Necrose das vilosidades e mucosa intestinal (seta). Coloração HE, barras A-C: 20 µm, barra D: 50 µm e barras E e F: 200 µm.

5.4 Exame ultraestrutural

Ao exame das imagens ultraestruturais dos órgãos foram identificadas extensas áreas de morte celular em todos os tecidos examinados, principalmente 6 e 9 hpi cujos achados foram mais severos em relação aos grupos 1 hpi, 3 hpi e controle. Dentre as alterações ultraestruturais mais comuns destacam-se cariólise ou cromatólise (Figura 10B); condensação da cromatina ou picnose (Figura 10-C); fragmentação da cromatina ou cariorrexe (Figura 10-D); perda da integridade das membranas de organelas e de membranas citoplasmáticas com dissolução de organelas (Figura 11-B); dilatação e destacamento de ribossomos dos retículos endoplasmáticos (RE) (Figura 11-D); edema de RE, membrana nuclear e mitocôndrias (Figura 12); presença de hemácias fora dos vasos indicando hemorragia e presença das bactérias no interior de células mortas e desorganizadas (Figura 13).

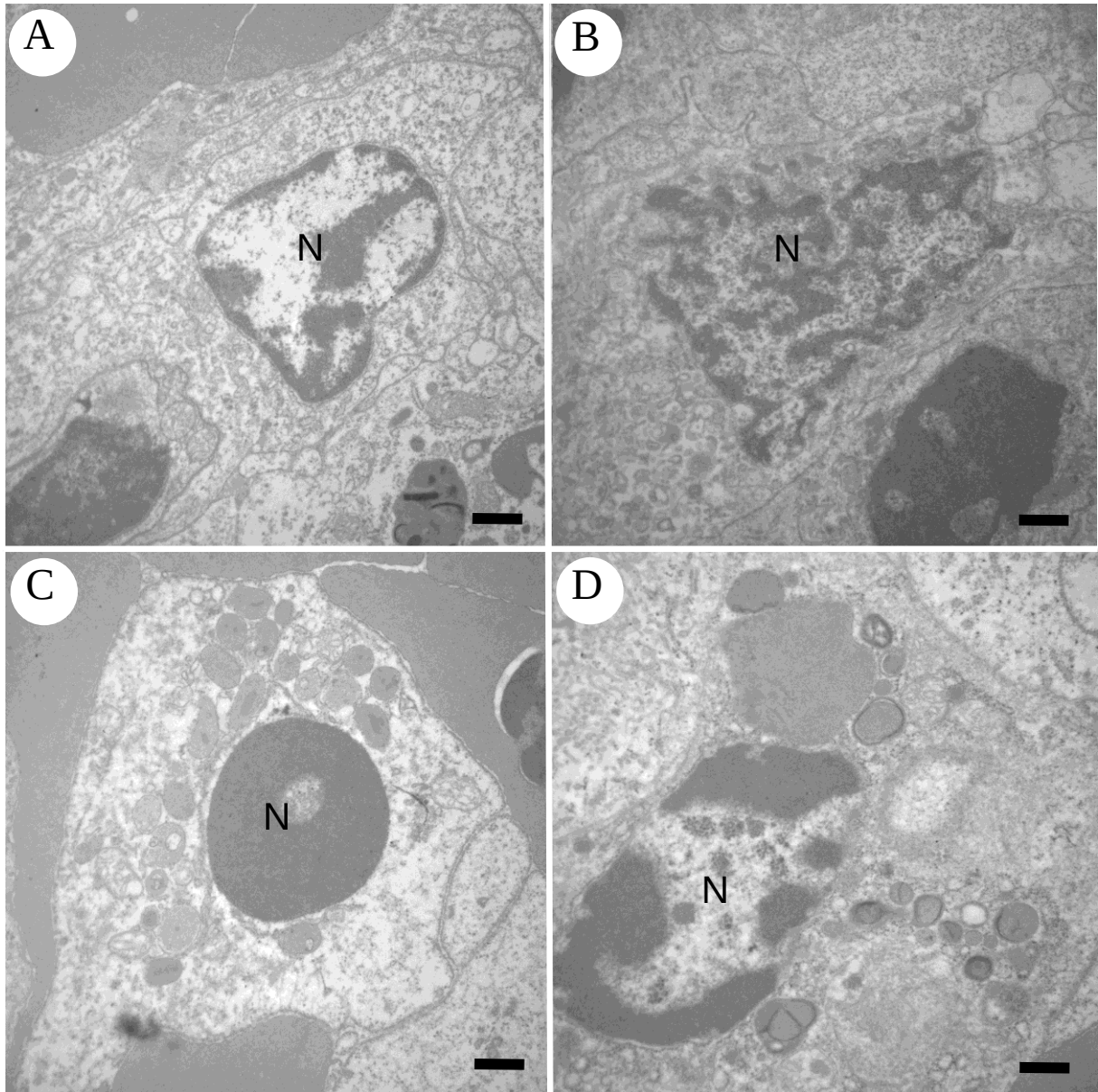


Figura 10 – Eletromicrografias de células de baço de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Núcleo normal (N). (B) Núcleo em cariólise (N). (C) Núcleo picnótico (N). (D) Núcleo em cariorrexe (N). Barras: 1 µm.

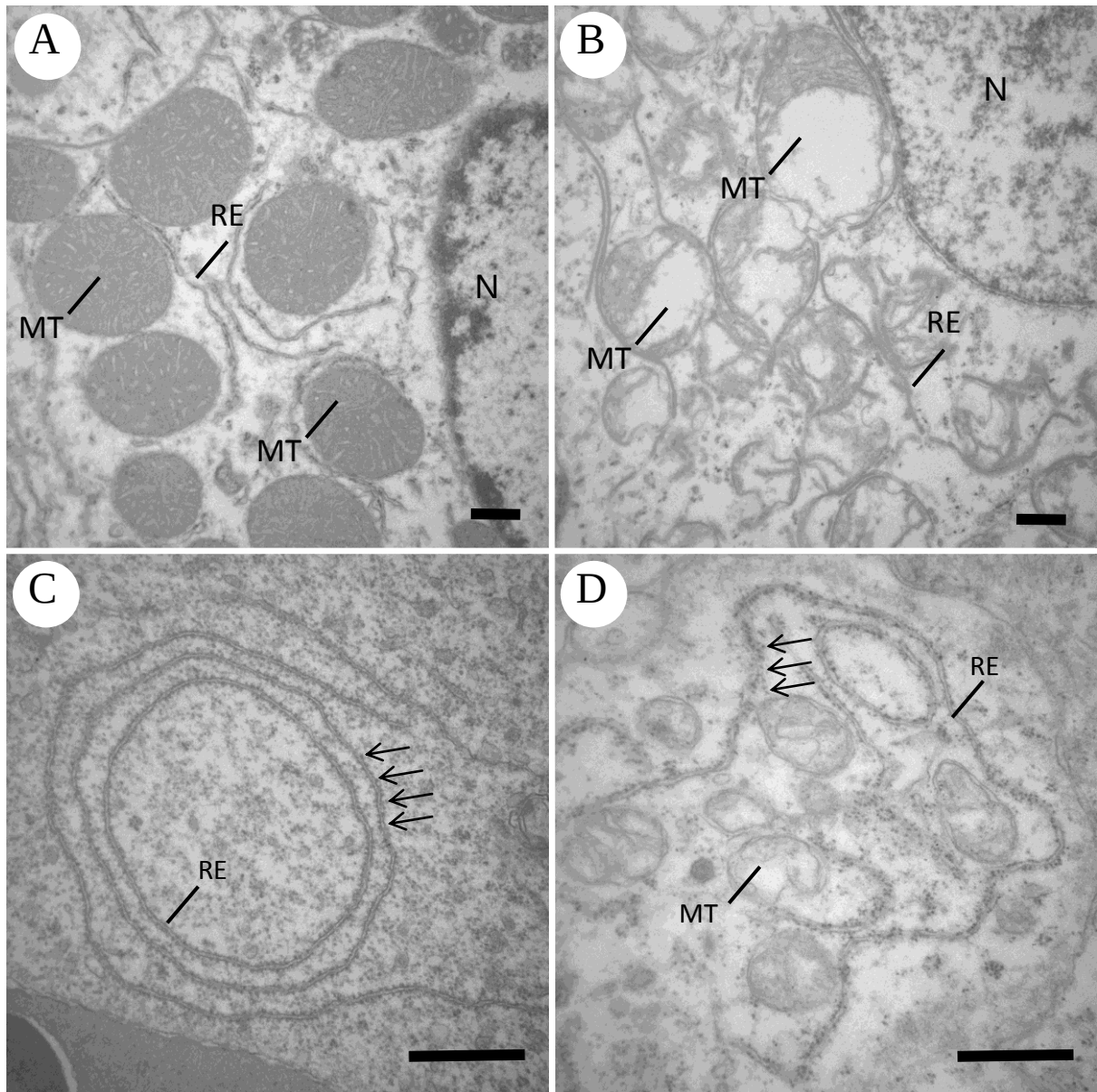


Figura 11 – Eletromicrografias de rim e coração de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*. (A) Célula de túbulo renal apresentando mitocôndrias (MT), retículos endoplasmáticos (RE) e núcleo (N) normais. (B) Célula de túbulo renal com perda da integridade das membranas e dissolução de mitocôndrias (MT) e retículos endoplasmáticos (RE). (C) Retículo endoplasmático (RE) com ribossomos aderidos (setas) de cardiomiócitos normais. (D) Dilatação e destacamento de ribossomos (setas) dos retículos endoplasmáticos (RE) de cardiomiócitos alterados. Barras: 1 μm .

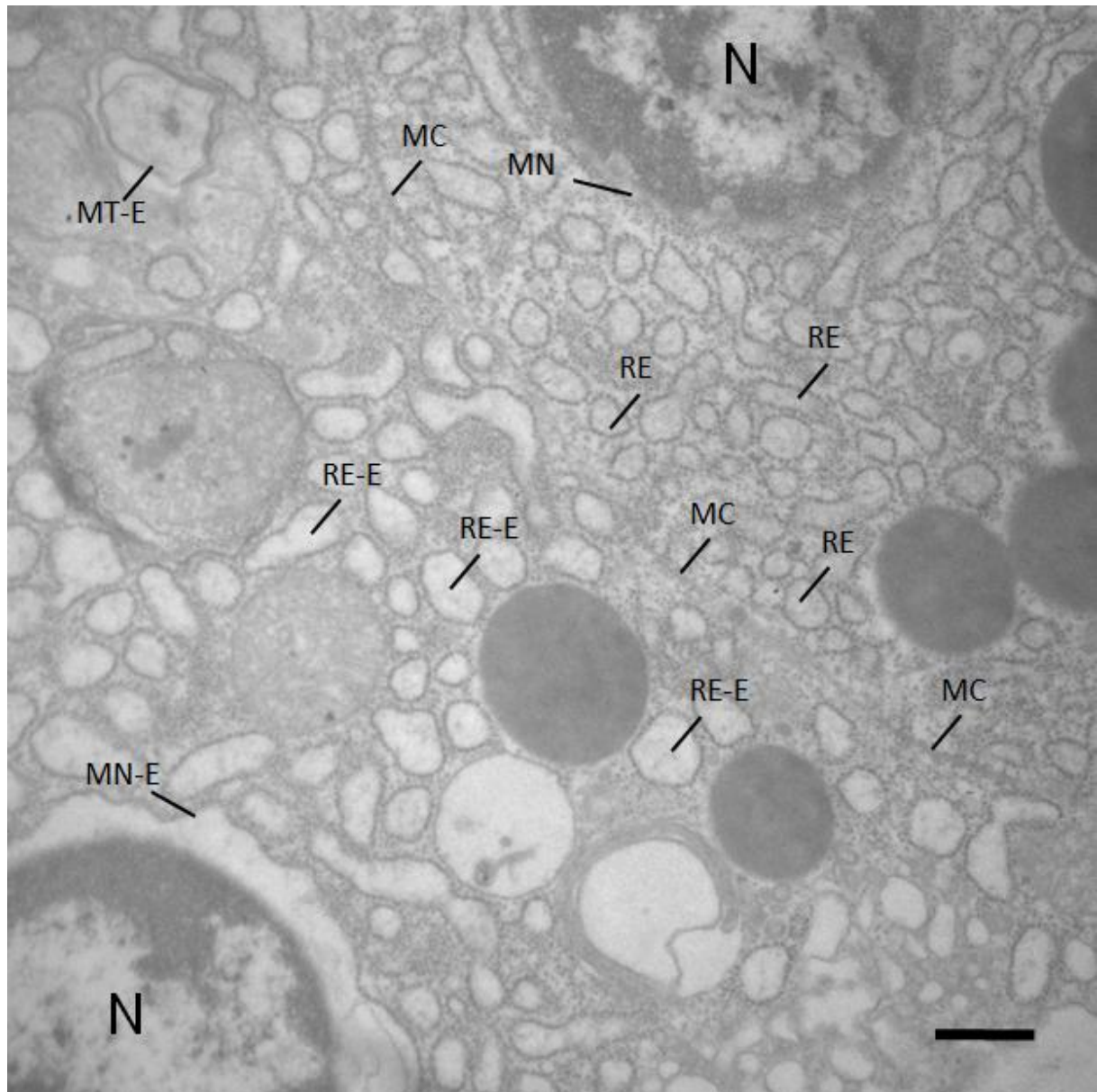


Figura 12 – Eletromicrografia do rim de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila* evidenciando uma célula renal na porção superior direita da imagem, com núcleo (N), membrana nuclear (MN) e retículos endoplasmáticos (RE) normais. Separada pela membrana citoplasmática (MC), outra célula situada na porção inferior esquerda da imagem, apresenta edema de retículo endoplasmático (RE-E), membrana nuclear (MN-E) e mitocôndrias (MT-E), barra: 1 μ m.

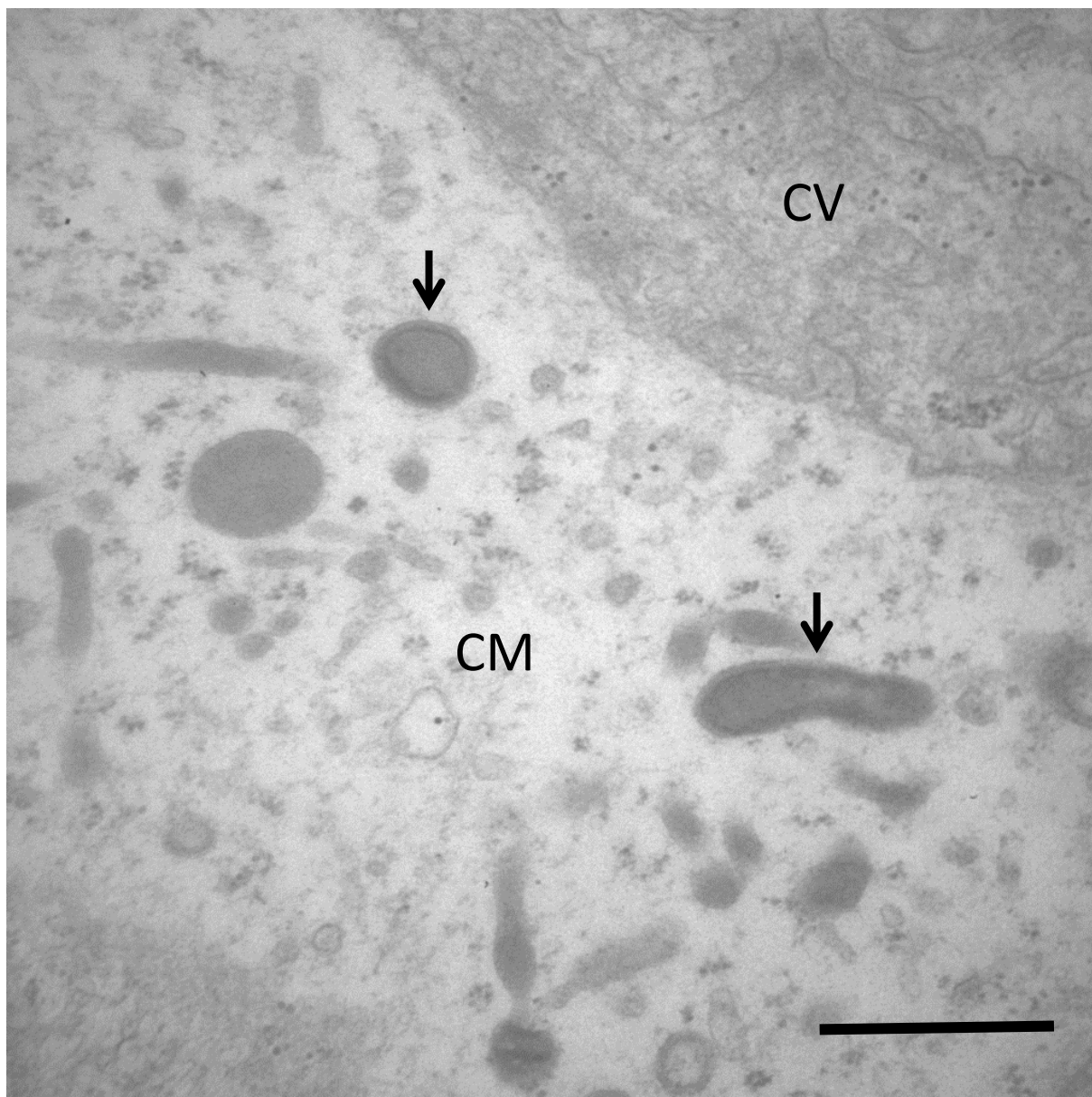


Figura 13 – Eletromicrografia de fígado de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila* revelando a presença das bactérias (setas) associadas uma célula morta ou em processo de morte (CM), ao seu lado pode se visualizar o citoplasma de uma célula viva (CV), barra: 1 μ m.

5.5 Mortalidade

Ao exame da Figura 14 observa-se que o grupo controle não teve mortalidade durante o período de avaliação (cinco dias ou 120 horas). O grupo inoculado apresentou mortalidade acumulada de 10,71% durante as primeiras 12 hpi, sendo que a primeira mortalidade ocorreu 9 hpi (Figura 14). A última observação de

mortalidade ocorreu 36 hpi, acumulando 71,42% das mortes e se mantendo nesse patamar até o final do período de observação.

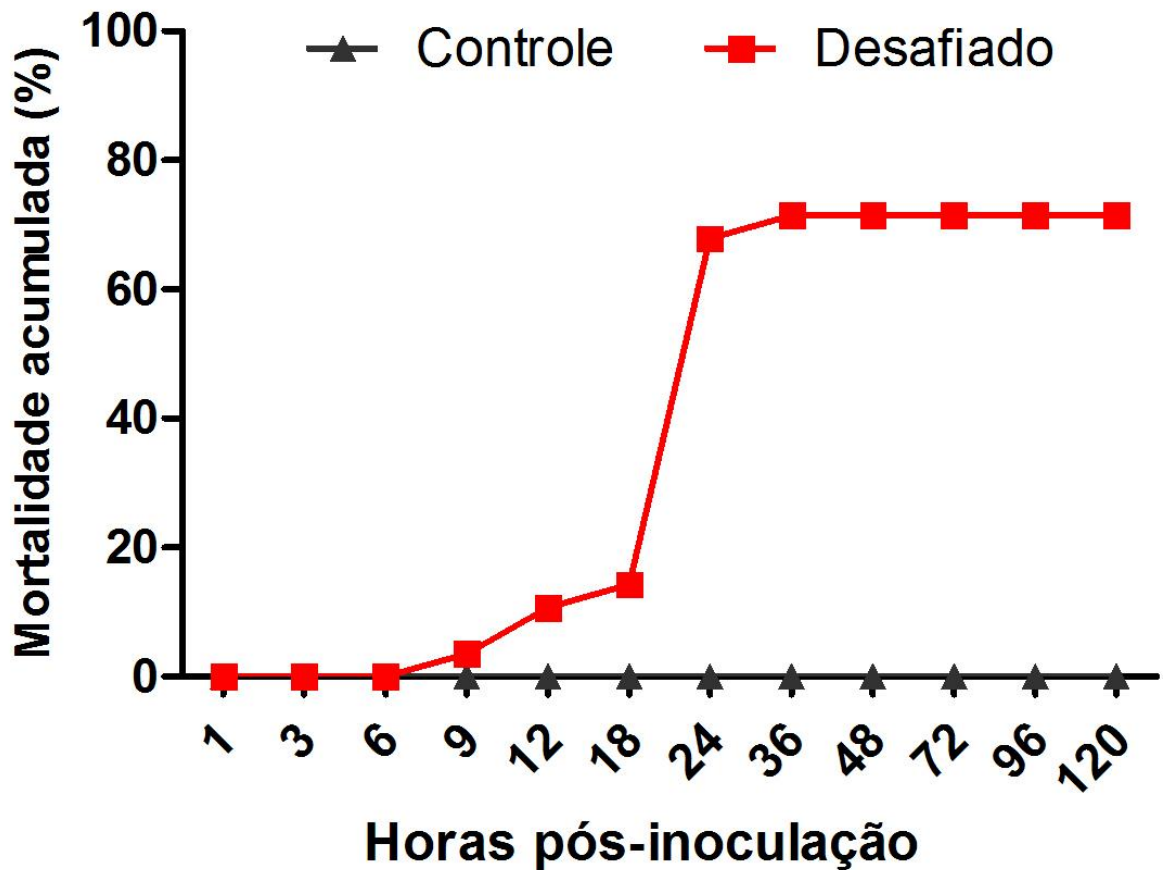


Figura 14 – Curva de mortalidade de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila* (n=28), grupo desafio, e injetados com salina (0,65%) estéril, grupo controle (n=28), durante o período total de observação de cinco dias (120 horas).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a cinética das lesões histopatológicas na fase aguda da aeromonose septicêmica experimental em pacus, revelando que o aparecimento de lesões macro e microscópicas se iniciou 6 horas pós-inoculação (hpi), sendo mais severas 9 hpi. O desenvolvimento e severidade das lesões estão relacionados à patogenicidade da bactéria, as *Aeromonas* são patógenos que

possuem vários fatores de virulência e por esse motivo a infecção pode se apresentar complexa e multifatorial (CHOPRA, HOUSTON, 1999; SCOARIS et al., 2008; WONG et al., 1998).

Durante as observações clínicas os peixes não apresentaram nenhum tipo de manifestação comportamental alterada até 9 hpi, o que pode ser relacionado à ausência de lesões graves em tecido nervoso desses animais, visto que distúrbios neurológicos como a natação errática são uma das principais alterações comportamentais de peixes acometidos por aeromonose (CARRIERO et al., 2016; FARTO et al., 2011). Outra hipótese que pode explicar a ausência de alterações comportamentais é que somente 9 hpi não seja suficiente para o aparecimento de tais manifestações, uma vez que Lin et al. (2007) mostraram que na fase aguda da infecção por *Aeromonas salmonicida* em *zebrafish* os sinais relacionados aos distúrbios de natação aconteceram somente a partir de 12 horas após a infecção experimental.

Ao exame macroscópico, os peixes inoculados com a bactéria apresentaram hemorragias petequiais em toda superfície corporal, nadadeiras e opérculos, congestão branquial e hemorragia ocular. Similarmente estudos de infecção com bactérias do gênero *Aeromonas* spp., em peixes ciprinídeos, demonstraram achados macroscópicos externos de escurecimento da pele, hemorragias em superfície corporal, nadadeiras, brânquias e focos hemorrágicos nos olhos (DAS et al., 2011; FICHI et al., 2013).

Os achados da inspeção interna do presente trabalho evidenciaram hemorragias em serosas e órgãos, acúmulo discreto de líquido serosanguinolento na cavidade, congestão e leve aumento de volume de órgãos e vasos superficiais, corroborando os achados descritos por Roberts (2001) em peixes acometidos com aeromonose. Da mesma maneira, Fichi et al. (2013) observaram em carpas crucianas (*Carassius carassius* L.) infectadas por *Aeromonas sobria* presença de hemorragias em órgãos internos, incluindo coração, rim, bexiga natatória e ovário.

As alterações hemorrágicas encontradas na macroscopia possivelmente ocorreram devido à resposta inflamatória aguda à infecção, pois é sabido que durante esse processo os leucócitos liberam substâncias vasoativas que causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular o que ocasiona a saída das

hemácias dos vasos (GARCIA LEME, 1989; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2004; MATSUYAMA, IIDA, 2001).

Ao exame microbiológico verificou-se que, mesmo em percentuais baixos, a bactéria foi detectada desde a primeira hora após a inoculação (1 hpi), alcançando 100 % de isolamentos positivos às 9 hpi em todos os órgãos e sangue dos peixes infectados. Essa rápida disseminação da *A. hydrophila* pelos tecidos dos pacus supostamente aconteceu em função da capacidade de motilidade dessa bactéria, a qual se movimenta com auxílio de flagelos.

Para as *Aeromonas* spp., um dos fatores de virulência mais importantes na colonização inicial de tecidos está relacionado à presença do flagelo polar, que permite a natação em ambientes líquidos, e de flagelos laterais que permitem a movimentação em superfícies viscosas, conferindo maior capacidade de invasão a essas bactérias (LOWRY et al., 2014). Em estudos da infecção por *Tenacibaculum maritimum*, microrganismo móvel que não possui flagelos, porém se movimenta por deslizamento, Faílde et al. (2013) detectaram a presença desta bactéria em órgãos internos de peixes (*Psetta maxima* L.) infectados somente 6 horas após a inoculação experimental. Comparando-se os dados desses autores com os encontrados no presente estudo, pode-se inferir que a presença do flagelo pode ter conferido maior precocidade na colonização inicial dos tecidos dos pacus, uma vez que a *A. hydrophila* foi encontrada já na primeira hora após a infecção.

Com o teste de quantificação da população bacteriana pôde-se observar uma curva ascendente nos órgãos e sangue, ressaltando os maiores valores para baço, fígado e rim em todos os tempos experimentais. Isso pode indicar que estes órgãos são mais predispostos à infecção por *A. hydrophila* em pacus, podendo facilitar o diagnóstico dessa enfermidade. Em estudos da estreptococose aguda experimental, Abdullah et al. (2013) isolaram colônias bacterianas de encéfalo, olho e rim 4 horas após a inoculação celomática de *Streptococcus agalactiae* em tilápias vermelhas (*Oreochromis* spp.), sendo o encéfalo determinado como órgão alvo deste microrganismo.

Os fatores de virulência das bactérias estão relacionados à capacidade de invasão, replicação e evasão do sistema imunológico do hospedeiro, causando lesões durante a patogênese da doença (VILCHES et al., 2004). Farto et al. (2013)

estudaram a capacidade de invasão e distribuição de três cepas de *A. salmonicida* subespécie *salmonicida*, sendo duas avirulentas e uma virulenta, em órgãos de peixes “pregados” (*Psetta maxima* L.) infectados experimentalmente. Os resultados mostraram que a cepa virulenta foi isolada em órgãos internos, principalmente fígado e rim, logo nas primeiras 12 hpi e se manteve presente em todos os tempos experimentais até a morte dos peixes após sete dias. Em contrapartida, as cepas avirulentas, raramente, foram isoladas de órgãos internos, sendo eliminadas por completo após quatro dias do desafio.

A histopatologia mostrou que *A. hydrophila* quando inoculada diretamente no celoma de pacus causa lesões em múltiplos órgãos, as quais foram observadas a partir das 6 hpi e foram mais severas 9 hpi. Como as *Aeromonas* spp. possuem capacidade de adesão às células teciduais, a severidade da doença depende dos tipos de fatores de virulência envolvidos e do *status* imunológico do hospedeiro, o que acarreta em diversos graus de injúria nos tecidos (ALBERT et al., 2000; SEN; RODGERS, 2004; SINHA et al., 2004).

Necrose, processos degenerativos, congestão vascular, hemorragia, edema celular, aumento do número de melanomacrófagos, infiltrados leucocitários e presença de colônias bacterianas foram as principais alterações histopatológicas nos órgãos dos pacus infectados observadas à microscopia de luz neste estudo.

Essas lesões certamente ocorreram devido à liberação de toxinas bacterianas e outros fatores de virulência inerentes à patogênese aeromonose, visto que a *A. hydrophila* produz endo e exotoxinas, como hemolisina e aerolisinas que causam ruptura de membranas celulares (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013; CHOPRA et al., 2000; HOWARD; BUCKLEY, 1985), enterotoxinas (DEL CORRAL; SHOTTS; BROWN, 1990; SHOTTS; TSU; WALTMAN, 1985), fator dermonecrótico, proteases, fosfolipases e DNases que causam danos teciduais e facilitam invasão e multiplicação bacteriana nas células do hospedeiro (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013; SHOTTS; TSU; WALTMAN, 1985).

Em estudos da patogênese de outras bacterioses que causam septicemia em peixes outros autores encontraram alterações histopatológicas semelhantes as do presente trabalho. Por exemplo: Aguado-Urda et al. (2014) observaram necrose em epitélio tubular renal e hemorragia em camadas compactas do coração em infecção

experimental com *Lactococcus garvieae* em zebrafish; Chong et al. (2015) encontraram, em enguias australianas inoculadas com *Erysipelothrix rhusiopathiae*, moderada congestão vascular encefálica e hepática; Carraschi et al. (2012) e Avci et al. (2014) relataram edema subepitelial em lamelas secundárias de brânquias, respectivamente em pacus infectados com *A. hydrophila* e trutas arco-íris infectadas com *Lactococcus garvieae*.

Bactérias que causam sepse frequentemente são observadas em locais de lesões ou associadas aos processos inflamatórios em teleósteos previamente desafiados ou naturalmente infectados (AGUADO-URDA et al., 2014; CHONG et al., 2015; GUDMUNDSDOTTIR et al., 2014), corroborando com a presença de colônias bacterianas observadas nos focos de lesões deste experimento. Isso ocorre devido aos componentes estruturais das *Aeromonas* spp., como flagelos, fímbrias; proteínas de membrana e LPS, que permitem a aderência dessas bactérias aos tecidos dos peixes (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013).

Outros estudos da septicemia bacteriana em peixes constataram que bagres híbridos (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) infectados com *Edwardsiella ictaluri* apresentaram a presença de infiltrados de linfócitos nos glomérulos renais (SUANYUK et al., 2014). Da mesma forma, ciprinídeos (*Puntius sarana*) desafiados com *A. hydrophila* apresentam aumento do número de melanomacrófagos e congestão de veias centrais em fígado (DAS et al. 2011).

O aumento de melanomacrófagos na infecção por *A. hydrophila* em pacus, possivelmente, está relacionado à lise de hemácias ocasionada por toxinas bacterianas como hemolisina e aerolisina, tendo em vista que essas células são responsáveis pela fagocitose de produtos da degradação eritrocitária como a hemossiderina (AGIUS; ROBERTS, 2003; FÜLÖP; McMILLAN, 1984; ROBERTS, 1975). Sendo esse mais um indicativo da ação de toxinas nos órgãos de pacus durante a fase aguda da aeromonose, posto que o aumento de melanomacrófagos esteja relacionado à resposta protetiva dos tecidos contra danos causados por radicais livres de bactérias (DAS et al., 2011).

Neste trabalho, as lesões observadas por meio da microscopia eletrônica de transmissão reforçam as observações da histopatologia, pois foram constatadas morte celular, com degeneração de organelas celulares e estreita associação das

lesões com a presença da bactéria nos órgãos infectados. Semelhantemente, enguias (*Anguilla anguilla*) infectadas por *Vibrio vulnificus* manifestaram a presença da bactéria intimamente associada às células necróticas, que apresentaram alterações na membrana celular e danos em organelas (VALIENTE et al., 2008).

O estudo da resistência do *Streptococcus iniae* dentro dos fagossomos de macrófagos de douradas (*Sparus aurata*) e pargos (*Pagrus pagrus*) foi também demonstrado em análises ultraestruturais, indicando que estas células podem ser importantes fontes de disseminação da bactéria em sistema nervoso, pois elas podem atravessar a barreira hematoencefálica sem qualquer resistência (AAMRI et al., 2015).

Os órgãos que apresentaram lesões microscópicas mais severas foram fígado, baço e rim, coincidindo com as maiores quantificações bacterianas. Mais um indício de que eles sejam os órgãos alvo da fase aguda da aeromonose septicêmica em pacus. Monaghan et al (2015) determinaram, por meio da hibridização *in situ*, que as brânquias e intestinos são os órgãos alvo da infecção aguda por herpesvírus Koi em carpas (*Cyprinus carpio*) desafiadas por imersão. Segundo os autores esses órgãos foram relevantes como porta de entrada na fase inicial da doença, reforçando a importância da determinação dos órgãos alvo no entendimento da patogênese de doenças infecciosas.

Na sepse, o simultâneo desenvolvimento de lesões em múltiplos órgãos provoca resposta inflamatória sistêmica aguda que pode levar à morte súbita (CHEN et al., 2011). A perda da homeostase orgânica devido à resposta inflamatória sistêmica leva ao choque séptico e hipotensão que causa a morte por colapso cardíaco (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Isto pode explicar o fato pelo qual a mortalidade observada no presente experimento teve início com 9 hpi, visto que este período foi concomitante ao dos achados anatomopatológicos e microbiológicos mais intensos da fase aguda, indicando que este seja o período de perda da homeostase orgânica de pacus acometidos por sepse aguda.

7 CONCLUSÃO

Os achados morfológicos e microbiológicos mostraram necrose, processos degenerativos, alterações vasculares e estreita associação da bactéria com essas lesões, principalmente 6 e 9 horas após a inoculação, demonstrando os mecanismos de ação dos fatores de virulência da *Aeromonas hydrophila* na fisiopatogenia da fase aguda da aeromonose septicêmica em órgãos de pacus. Baço, fígado e rim foram os órgãos mais afetados, podendo ser indicados como órgãos alvo da infecção, o que pode auxiliar no diagnóstico de casos agudos de dessa afecção em pacus.

8 REFERÊNCIAS

- AAMRI, F. E.; CABALLERO, M. J.; REAL, F.; ACOSTA, F.; DÉNIZ, R.; ROMÁN, L.; PADILLA, D. *Streptococcus iniae* in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*, L.) and Red Porgy (*Pagrus pagrus*, L.): Ultrastructural Analysis. **Veterinary Pathology**, v. 52, p. 209-212, 2015.
- ABDULLAH, S.; OMAR, N.; YOSOFF, S. M.; OBUKWHO, E. B.; NWUNUJI, T. P.; HANAN, L.; SAMAD, J. Clinicopathological features and immunohistochemical detection of antigens in acute experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia (*Oreochromis* spp.). **Springerplus**, v. 2, n. 286, p. 01-07, 2013.
- ABEYTA JÚNIOR, C.; KAYSNER, C. A.; WEKELL, M. M.; STOTT, R. F. Incidence of motile aeromonas from United States west coast shellfish growing estuaries. **Journal Food Protection**, v. 53, n. 10, p. 849-855, 1990.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003.
- AGUADO-URDA, M.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; HERAS, A. I.; BLANCO, M. M.; ACOSTA, F.; CID, R.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; GIBELLO, A. Experimental *Lactococcus garvieae* infection in zebrafish and first evidence of its ability to invade non-phagocytic cells. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 248-254, 2014.
- ALBERT, M. J.; ANSARUZZAMAN, M.; TALUKDER, K. A.; CHOPRA, A. K.; KUHN, I.; FARUQUE, A. S. G.; ISLAM, M. S.; SACK, R. B.; MOLBY, R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* sp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p. 3785-3790, 2000.

ANDRADE, J. A. B.; FREYMÜLLER, E.; FAGUNDES-NETO, U. Pathophysiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infection: an experimental model utilizing transmission electron microscopy. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 47, p. 306-312, 2010.

AVCI, H.; BIRINCIÖGLÜ, S. S.; TANRIKUL, T. T.; EPIKMEN, E. T.; METIN, N.; AVSEVER, M. L. Experimental *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792: a comparative histopathological and immunohistochemical study. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 481-495, 2014.

BAKKEMO, K. R.; MIKKELSEN, H.; BORDEVİK, M.; TORGERSEN, J.; WINTHER-LARSEN, H. C.; VANBERG, C.; OLSEN, R.; JOHANSEN, L. H.; SEPPOLA, M. Intracellular localisation and innate immune responses following *Francisella noatunensis* infection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) macrophages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, p. 993-1004, 2011.

BARBOSA, H. M. R.; SILVA, M.; FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R. Ultrastructural study of the TG180 murine sarcoma cell invasion by *Toxoplasma gondii*: comparison between *in vivo* and *in vitro* cell cultures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 265-270, 2000.

BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p. 371-388, 2013.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v. 31, p. 687-694, 2001.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Annals of Internal Medicine: Journal**, v. 115, p. 457-469, 1991.

BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A.; BITTENCOURT, F.; CANZI, C. **Manual Técnico: Criação de pacu em tanque-rede para produção de carne mecanicamente separada (CMS)**, Toledo-PR, 50p, 2010.

BORCHARDT, M. A.; STEMPER, M. E.; STANDRIDGE, J. H. *Aeromonas* Isolates from Human Diarrheic Stool and Groundwater Compared by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 224-228, 2003.

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama: Auburn University, p. 482, 1990.

BRICEÑO, A. L.; CONTRERAS, Z. P.; VERA, D. D.; BRICEÑO, R. V. M.; PRÜ, E. P. Effects of *Aeromonas caviae* co-cultured in mouse small intestine. **Interciencia**, v. 31, p. 446-450, 2006.

BRICEÑO, A. L.; CONTRERAS, Z. P.; VERA, D. D.; BRICEÑO, R. V. M.; PRÜ, E. P. Experimental toxicity of *Aeromonas* spp. in mouse's small intestine: ultrastructural aspects. **Interciencia**, v. 33, p. 457-460, 2008.

BRUDAL, E.; LAMPE, E. O.; REUBSAET, L.; ROOS, N.; HEGNA, I. K.; THRANE, I. M.; KOPPANG, E. O.; WINTHER-LARSEN, H. C. Vaccination with outer membrane vesicles from *Francisella noatunensis* reduces development of francisellosis in a zebrafish model. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42, p. 50-57, 2015.

CARNEVIA, D.; LETAMENDIA, M.; PERRETTA, A.; DELGADO, E. Caracterización de septicemia hemorrágica bacteriana (SHB), diagnosticadas en peces ornamentales de Uruguay. **Veterinaria (Montevideo)**, v. 46, p. 27-31, 2010.

CARRASCHI, S. P.; CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J. G.; IGNÁCIO, N. F.; BARBUIO, R.; MACHADO, M. R. F. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 83, p. 115-120, 2012.

CARRIERO, M. M.; MENDES MAIA, A. A.; MORO SOUSA, R. L.; HENRIQUE-SILVA, F. Characterization of a new strain of *Aeromonas dhakensis* isolated from diseased pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, p. 01-11, 2016.

CERESER, N. D.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; MARTINELI, T. M.; SOUZA, V.; RODRIGUES, L. B.; CARDOZO, M. V. Aeromonas no processamento de queijos tipos minas frescal e colonial. **Ars Veterinária**, v. 29, n. 1, p. 23-29, 2013.

CHEN, D. F.; WANG, K. Y.; GENG, Y.; WANG, J.; HUANG, X. L.; HE, M. Pathological changes in cultured channel catfish *Ictalurus punctatus* spontaneously infected with *Streptococcus iniae*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 95, p. 203-208, 2011.

CHONG, R. S. M.; SHINWARI, M. W.; AMIGH, M. J.; AVARENA-ROMAN, M.; RILEY, T. V. First report of Erysipelothrix rhusiopathiae-associated septicaemia and histologic changes in cultured Australian eels, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner, 1867) and *A. australis* (Richardson, 1841). **Journal of Fish Diseases**, v. 38, p. 839-847, 2015.

CHOPRA, A. K.; HOUSTON, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. **Microbes and Infection**, v.1, n.13, p.1129-1137, 1999.

CHOPRA, A. K.; XU, X. J.; RIBARDO, D.; GONZALEZ, M.; KUHL, K.; PETERSON, J. W.; HOUSTON, C. W. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2808-2818, 2000.

CIPRIANO, R. C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **Fish Disease Leaflet**, v. 68, p. 1-25, 2001.

CLAUDIANO, G. S. **Aspectos da fisiopatologia da sepse em *Piaractus mesopotamicus* induzida por *Aeromonas hydrophila***. 2015. 95 f. Tese – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins - Patologia Estrutural e Funcional. In: COLLINS, T. **Inflamação aguda e crônica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-78.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. **TecArte**, p. 533, 2004.

DAS, A.; SAHOO, P. K.; MOHANTY, B. R.; JENA, J. K. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in *Puntius sarana*: Early changes in blood and aspects of the innate immune-related gene expression in survivors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.142, p. 207-218, 2011.

DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GINSBERG, H. S. **Microbiology**. New York, 4. ed. Philadelphia: Kyoto, cap. 27, p. 561-587, 1990.

DEL CORRAL, F.; SHOTTS, E. B.; BROWN, J. Adherence haemagglutination and cell surface characteristics of motile aeromonads virulent for fish. **Journal of fish Diseases**, v. 13, p. 255-268, 1990.

DEODHAR, L. P.; SARASWATHI, K.; VARUDKAR, A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 853-856, 1991.

DUNG, T. T.; NGOC, N. T. N.; THINH, N. Q.; THY, D. T. M.; TUAN, M. A.; SHIN, A.; CRUMLISH, M. Common diseases of pangasius catfish farmed in Vietnam. **Global Aquaculture Advocate**, v.11, p.77-78, 2008.

FAÍLDE, L. D.; LOSADA, A. P.; BERMÚDEZ, R.; SANTOS, Y.; QUIROGA, M. I. *Tenacibaculum maritimum* infection: Pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.). **Microbial Pathogenesis**, v. 65, p. 82-88, 2013.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**, Roma, 200p, 2016.

FARTO, R.; MILTON, D. L.; BERMÚDEZ, M. B.; NIETO, T. P. Colonization of turbot tissues by virulent and avirulent *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains during infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 95, p. 167-173, 2011.

FEHR, A.; ESHWAR, A. K.; NEUHAUSS, S. C. F.; RUETTEN, M.; LEHNER, A.; VAUGHN, L. Evaluation of zebrafish as a model to study the pathogenesis of the

opportunistic pathogen *Cronobacter turicensis*. **Emerging Microbes and Infections**, v. 4, p. 01-09, 2015.

FICHI, G.; CARDETI, G.; COCUMLLI, C.; VENDRAMIN, N.; TOFFAN, A. ELENI, C.; SIEMINI, N.; FISCHETTI, R.; SUSINI, F. Detection of Cyprinid herpesvirus 2 in association with na *Aeromonas sobria* infection of *Carassius carassius* (L.), in Italy. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p. 823-830, 2013.

FOGELSON, S. B.; PETTY, B. D.; REICHLEY, S. R.; WARE, C.; BOWSER, P. R.; CRIM, M. J.; GETCHELL, R. G.; SAMS, K. L.; MARQUIS, H.; GRIFFIN, M. J. Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 3, p. 338-344, 2016.

FRACASSO, J. F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 119-127, 2008.

FREUNDENBERG, M. A. The fate of lipopolisaccharides in rats: evidence for chemical alteration in the molecule. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, p. 483-487, 1984.

FÜLÖP, G. M. I.; McMILLAN, D. Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 179, n. 2, p. 175-195, 1984.

GALLETI, S. R. Introdução à microscopia electronica. **Biológico**, v. 65, p. 33-35, 2003.

GARCIA, F.; MORAES, F. R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. *Acta Scientiarum*. **Biological Sciences**, v. 31, p. 17-21, 2009.

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

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. 2009. Ed. Science publishers, 211p.

GUDMUNDSDOTTIR, B. K.; GUDMUNDSDOTTIR, S.; GUDMUNDSDOTTIR, S.; MAGNADOTTIR, B. Yersiniosis in Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), characterization of the infective strain and host reactions. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 511-519, 2014.

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. In: BROWN. L. (Ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**, Oxford: Pergamon Press, 1993. cap. 14, p. 223-247.

HOSSEINI, R.; LAMERS, G. E. M.; HODZIC, Z.; MEJIR, A. H.; SCHZZF, M. J. M.; SPAINK, H. P. Correlative light and electron microscopy imaging of autophagy in a zebrafish infection model. **Autophagy**, v. 10, p. 1844-1857, 2014.

HOWARD, S. P.; BUCKLEY, J. T. Activation of the hole-forming toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay. **Infection and Immunity**, v. 50, p. 322-323, 1985.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 43, 47p, 2015.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, p. 35-73, 2010.

KARUNASAGAR, I; KARUNASAGAR, I. Diagnosis, treatment and prevention of bacterial diseases of fish and shellfish. **Current Science**, v. 73, n. 3, p. 387-399, 1999.

KNOBEL, E. Fisiopatologia do choque e da disfunção de múltiplos órgãos. In: _____. **Condutas no Paciente Grave**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 41-60.

KOZINSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **Journal of Fish Diseases**, v. 30, p. 293-301, 2007.

KOZINSKA, A.; PEKALA, A. serotyping of *Aeromonas* species isolated from Polish fish farms in relation to species and virulence phenotype of the bacteria. **Bull Veterinary Institute Pulawy**, v. 54, p. 315-320, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran Patologia – **Bases Patológicas das Doenças**. In: _____. **Inflamação aguda e crônica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 49-89.

LIN, B.; CHEN, S.; CAO, Z.; LIN, Y.; MO, D.; ZHANG, H.; GU, J.; DONG, M.; LIU, Z.; XU, A. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 295-301, 2007.

LOWRY, R.; BALBOA, S.; PARKER, J. L; SHAW, J. G. *Aeromonas* Flagella and Colonisation Mechanisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 65, p. 203-256, 2014.

LUNA L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw/Hill, p. 258, 1968.

MADDEN, N. P.; LEVINSKY, R. J.; BAYSTON, R.; HARVEY, B.; TURNER, M. W.; SPITZ, L. Surgery, sepsis, and nonspecific immune function in neonates. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 24, p. 562-566, 1989.

MATSUYAMA T., IIDA T. Influence of tilapia mast cell lysate on vascular permeability. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 549–556, 2001.

McDANIEL, D. **American Fisheries Society: Fish Health Section**. In: Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Washington: Copyright, 1979. p. 118.

MONAGHAN, S. J.; THOMPSON, K. D.; ADAMS, A.; KEMPTER, J.; BERGMANN, S. M. Examination of the early infection stages of koi herpesvirus (KHV) in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. using in situ hybridization. **Journal of Fish Diseases**, v. 38, p. 477-489, 2015.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições pré-disponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTANGNOLLI, N. (Ed) **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, p. 343-386, 2004.

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

NAYAK, S. K.; SWAIN, P.; NANDA, P. K.; DASH, S.; SHUKLA, S.; MEHER, P. K. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, p. 394-399, 2008.

NDUKA, O.; PARRILLO, J. E. The Pathophysiology of Septic Shock. **Critical Care Nursing Clinics of North America: Journal**, v. 23, p. 41-66, 2011.

NGUYEN-CHI, M.; PHAN, Q. T.; GONZALEZ, C.; DUBREMETZ, J. F.; LEVRAUD, J. P.; LUTFALLA, G. Transient infection of the zebrafish notochord with *E. coli* induces chronic inflammation. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, p. 871-882, 2014.

NIELSEN, M. E.; HOI, L.; SCHIMDT, A. S.; QIAN, D.; SHIMADA, T.; SHEN, J. Y., LARSEN, J. L. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 46, p. 23-29, 2001.

OROZOVA, P.; CHIKOVA, V.; KOLAROVA, V.; NEVORA, R.; KONOVSKA, M.; NAJDENSKI, H. Antibiotic resistance of potentially pathogenic *Aeromonas* strains. **Trakia Journal of Sciences**, v. 6, p. 71-77, 2008.

POPOFF, M. III Genus *Aeromonas* Kluyver e van Niel, 1936. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 1, p. 545–548, 1984.

RAU, S., KOHN, B., RICHTER, C., FENSKE, N., KÜCHENHOFF, H., HARTMANN, K., HÄRTLE, S., KASPERS, B., HIRSCHBERGER, J. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response 86

syndrome and sepsis. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 36, p. 253-260, 2007.

R Development Core Team (2011). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <<http://www.R-project.org>>.

ROBERTS, R. J. 2001. **Fish Pathology**. W. B. Saunders. London, 472 p.

ROBERTS R. J. Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. In: RIBELIN, W. E.; MIGAKI, G. (Ed.). **The pathology of fishes**. Madison: University of Wisconsin Press, p. 399-428, 1975.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative techniques for Aquatic Animals**. 2^a ed. London: Willey-Blackwell Publishing; 2008.

SALLES, M. J. C.; SPROVIERI, S. R. S.; BEDRIKOW, R.; PEREIRA, A. C.; CARDENUTO, S. L.; AZEVEDO, P. R. C.; SILVA, T. M.; GOLIN, V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, p. 86-92, 1999.

SARKAR, A.; SAHA, M.; ROY, P. Identification and typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR fingerprinting. **Aquaculture Research and Development**, v.3, n.6, p. 2-4, 2012.

SCOARIS, D. O.; COLACITE, J.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; ABREU FILHO, B. A.; DIAS FILHO, B. P. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, p. 111-122, 2008.

SEN, K; RODGERS M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p.1077- 1086, 2004.

SINHA, S.; SHIMADA, T.; RAMAMURTHY, T.; BATTACARYA, S. K.; YAMASAKY, S.; TAKEDA, Y.; NAIR, G. B. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.53, p. 527 -534, 2004.

SHIMADA, M. T.; CLAUDIANO, G. S.; ENGRÁCIA FILHO, J. R.; YUNIS, J.; MORAES, F. R.; MOREIRA, R. G.; MORAES, J. R. E. Hepatic Steatosis in Cage-Reared Young Cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), in Brazil. **Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis**, v. 3, p. 01-04, 2014.

SHOTTS, E. B.; TSU, T. C.; WALTMAN, W. D. Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. **Fish Pathology**, v. 20, p. 37-40, 1985.

SIPAÚBA-TAVARES, L. E.; MORENO, S. Q. Variação dos parâmetros limnológicos em um viveiro de piscicultura nos períodos de seca e chuva. **Revista Unimar**, Marília, v.16, p.229-242, 1994.

SOUZA, V.L.; ORIVES-LUNARDI, L.; VASQUES, L.H.; CASALETI, L.; NAKAGHI, L.S.O.; URBINATI, E.C. Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen in pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) during food restriction and refeeding. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 15-20, 2001.

STOSKOPF, M. K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, p. 269-277, 1993.

SUANYUK, N.; ROGGE, M.; THUNE, R.; WATTANAOHIROMSAKUL, M. CHAMPHAT, N.; WIANGKUM, W. Mortality and pathology of hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell), associated with *Edwardsiella ictaluri* infection in Southern Thailand. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 385-395, 2014.

TOMÁS, J. M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 01-22, 2012.

TRUST, T. J.; BULL, L. M.; CURRIE, B. R.; BUCKLEY, J. T. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 36, p. 1174-1179, 1974.

VALIENTI, E.; PADRO'S, F.; LAMAS, J.; LLORENS, A.; AMARO, C. Microbial and histopathological study of the vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E in eels: The metalloprotease Vvp is not an essential lesional factor. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 386-393, 2008.

VELANDIA, M.L.; PÉREZ-CASTRO, R.; HURTADO, H.; CASTELLANOS, J. E. Ultrastructural description of rabies virus infection in cultured sensory neurons. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 441-447, 2007.

VILCHES, S.; URGELL, C.; MERINO, S. M.; CHACON, R.; SOLER, L.; CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M. J.; TOMAS JUAN, M. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6914-6919, 2004.

VILELA, R. C.; BENCHIMOL, M. *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*: interaction with fibroblasts and muscle cells - new insights into parasite-mediated host cell cytotoxicity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 720-727, 2012.

WEDEMEYER, G.; ROSS, A. J.; SMITH, L. Some metabolic effects of bacterial endotoxin in salmonid fishes. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, Toronto, v. 26, p. 115-122, 1970.

WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W (Ed.). Viral, Bacterial and Fungal Infections. **Fish Diseases and Disorders**, CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, U.K., v. 3, p. 874, 2003.

WONG, C. Y. F.; HEUZENROEDER, M. W.; FLOWER, R. L. P. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. **Microbiology**, v. 144, p. 291-298, 1998.

YOGANANTH, N.; BHAKYARAJ, R.; CHANTHURU, A.; ANBALAGAN, T.; MULLAI NILA, K. Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish Samples Using PCR Technique, **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 4, p. 51-53, 2009.