

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**“Influência do manejo reprodutivo e da despesca
na saúde de *Astyanax altiparanae*”.**

Norquis Caled Alvarez Rubio

Jaboticabal, SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**“Influência do manejo reprodutivo e da despesca
na saúde de *Astyanax altiparanae*”.**

Norquis Caled Alvarez Rubio

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, SP

2020

Alvarez Rubio, Norquis Caled
A473i Influência do manejo reprodutivo e da despesca na saúde de (*Astyanax altiparanae*) / Norquis Caled Alvarez Rubio. -- Jaboticabal, 2020
xi, 81 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2018
Orientadora: Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Banca examinadora: Marcello Pardi de Castro, Geovana Dotta Tamashiro
Bibliografia

1. Lambaris. 2. Septicemia hemorrágica. 3. Aeromonose. 4. Sanidade aquícola. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Influência do manejo reprodutivo e da despesca na saúde
de *Astyanax altiparanae*

AUTOR: NORQUIS CALED ALVAREZ RUBIO

ORIENTADORA: JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

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

Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pós-Doutoranda GEOVANA DOTT
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura da UNESP,
CAUNESP

Prof. Dr. MARCELLO PARDI DE CASTRO
/ Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto-SP

Jaboticabal, 18 de fevereiro de 2020.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	vii
DEDICATÓRIA.....	viii
AGRADECIMENTOS	ix
APOIO FINANCIERO	xi
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Produção aquícola mundial e no Brasil.....	3
1.2 Lambari como espécie de produção	4
1.3 Características produtivas do lambari	4
1.4 Pesquisas no lambari.....	5
1.5 Doenças na piscicultura	5
1.6 Fatores predisponentes às bacterioses na piscicultura	6
1.7 Temperatura da água	6
1.8 pH da água	7
1.9 Sexo e reversão sexual.....	8
1.10 Rede de despesca	9
1.11 Gênero <i>Aeromonas</i>	11
1.12 <i>Aeromonas hydrophila</i>	11
1.13 Aeromonose no lambari	12
1.14 Fatores de virulência e fatores predisponentes à infecção	13
1.15 Prevenção à infecção	13
1.16 Sinais clínicos e alterações anatomopatológicas	13
1.17 Tratamento da doença.....	14
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
3. OBJETIVO GERAL.....	33
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5. CAPÍTULO 1.....	34
5.1 INTRODUÇÃO	34
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.2.1 Peixes e condições experimentais	36
5.2.2 Delineamento experimental	37
5.2.3 Bactéria e preparação do inóculo bacteriano	39

5.2.4	Infecção experimental	41
5.2.5	Teste de fluoresceína	41
5.2.6	Sobrevivência acumulada	41
5.2.7	Análise histopatológica.....	42
5.2.8	Análise estatística	42
5.3	RESULTADOS.....	42
5.4	DISCUSSÃO	46
5.5	CONCLUSÕES.....	49
5.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
6.	CAPÍTULO 2.....	55
6.1	INTRODUÇÃO	55
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
6.2.1	Experimento 1	56
6.2.2	Reprodução e obtenção das larvas.....	56
6.2.3	Peixes e condições experimentais	57
6.2.4	Delineamento experimental.....	57
6.2.5	Experimento 2.	59
6.2.6	Delineamento experimental.....	59
6.2.7	Bactéria, preparação do inóculo.....	60
6.2.8	Infecção experimental	61
6.2.9	Exame clínico, alterações macroscópicas.....	61
6.2.10	Sobrevivência acumulada	62
6.2.11	Avaliação microbiológica.....	62
6.2.12	Histopatologia.....	62
6.3	RESULTADOS.....	62
6.3.1	Primeiro experimento	62
6.3.2	Segundo experimento	66
6.4	DISCUSSÃO.....	68
6.4.1	Experimento 1	68
6.4.2	Experimento 2	70
6.5	CONCLUSÕES.....	72
6.6	REFERÊNCIAS	73
ANEXO 1. Certificado da comissão de ética no uso de animais (capítulo 1) ...		79
ANEXO 2. Certificado da comissão de ética no uso de animais (capítulo 2) ...		80
ANEXO 3. Artigo publicado na revista Aquaculture Reports		81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental do experimento.	38
Figura 2. Imagens dos três tipos de materiais de rede de captura utilizadas no experimento: rede de nylon, rede de polipropileno, rede de polietileno.	39
Figura 3. Lesões cutâneas em lambaris manejados com distintos tipos de material de rede e infectados com <i>A. hydrophila</i> pelo método de banho de imersão. A. Pele e escamas intatas (animal não infectado) B. Perda de escama e erosão da pele (peixe manejado com rede de polipropileno e infectado, seta branca). C. Erosão e equimose na nadadeira caudal (seta branca). Úlcera hemorrágica (seta preta) (manejado com rede de nylon e infectado). D. Úlcera (seta preta)(peixe manejado com rede de polipropileno e infectado). Barra 1 cm.	43
Figura 4. Alterações histopatológicas em <i>A. altiparanae</i> sobreviventes a infecção experimental via banho com <i>A. hydrophila</i> . (A) Pele. Solução de continuidade do epitélio e hemorragia. Barra 200 µm. (B) Fígado. Leve congestão da veia central e leve degeneração hidrópica. Barra 100 µm (C). Brânquias. Moderada a severa congestão. Barra 20 µm. Coloração H&E.	44
Figura 5. Padrões de integridade cutânea detectada pelo teste de fluoresceína em <i>A. altiparanae</i> imediatamente após o manuseio com diferentes tipos de materiais de rede de captura (A) Nylon. (B) Polipropileno. (C) Polietileno. (D) Grupo manejado sem rede. À esquerda, peixe sob luz regular, à direita, peixe sob luz preta.	45
Figura 6. Sobrevivência de <i>A. altiparanae</i> manipulados com diferentes tipos de rede e após desafio por imersão com <i>A. hydrophila</i> por 12 dias. T1♀-T1 ♂ (rede de nylon), T2♀-T2 ♂ (rede de polipropileno), T3♀-T3 (rede de polietileno), T4♀-T4 ♂ (manuseado sem rede).	46
Figura 7. Desenho experimental do segundo experimento: <i>Astyanax altiparanae</i> suplementados com diferentes concentrações de 17β-estradiol e infectados experimentalmente com <i>Aeromonas hydrophila</i>	58
Figura 8. Alterações macroscópicas de <i>Astyanax altiparanae</i> desafiadas com <i>Aeromonas hydrophila</i> . (A) Lesões ulcerativas e hemorrágicas. (B) Fígado pálido (seta branca). (C) Brânquias área de necrose (seta branca). Barra 1 cm.	63
Figura 9. Alterações histopatológicas em <i>A. altiparanae</i> sobreviventes à infecção experimental via banho com <i>A. hydrophila</i> . A. Pele: Infiltrado inflamatório na derme e músculo (setas), B. Intestino: Hiperplasia de células caliciformes(*) e infiltrado inflamatório (setas), C. Fígado: congestão da veia central(*) e degeneração hidrópica (setas), D. Brânquias: Congestão de lamelas branquiais (setas). Coloração H&E.	65
Figura 10. Sobrevivência 12 dias após desafio por imersão com <i>A. hydrophila</i> em lambaris de rabo amarelo suplementados com diferentes quantidades de 17β-estradiol. Grupo T1♀-T1 ♂ (0 mg kg ⁻¹), T2♀-T2 (2 mg kg ⁻¹), T3♀-T3 (4 mg kg ⁻¹).	66
Figura 11. Sobrevivência de <i>A. altiparanae</i> mantidos sob diferentes temperaturas após desafio por imersão com <i>A. hydrophila</i> por 12 dias. Grupo T1: 21°C; T2: 25°C; T3: 29°C; T4: 33°C.	67
Figura 12. Sobrevivência de <i>A. altiparanae</i> mantidos sob a diferentes pH da água após desafio por imersão com <i>A. hydrophila</i> por 12 dias. Grupo T1: 5 pH; T2: 6 pH; T3: 7 pH; T4: 8 pH.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sobrevivência de <i>Astyanax altiparanae</i> após suplementação com estradiol e desafio bacteriano.	64
--	----

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais, Henry Alvarez Garcia e Delmira Rubio Ortega com todo meu amor e gratidão, por tudo o que fizeram por mim ao longo da minha vida, os quais com carinho e humildade, me ensinaram o amor pela vida e respeito ao próximo.

Às minhas irmãs e irmãos: Erica Alvarez Rubio, Marlítd Alvarez Rubio, Heiler Alvarez e Henrredin Alvarez pelo carinho e motivação para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, por estar presente em todos os momentos da minha vida, e me dando forças para continuar mostrando o caminho seguro nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Henry Alvarez Garcia e Delmira Rubio Ortega pelo amor incondicional, pela a dedicação e também pelo apoio em todas as horas e escolhas da minha vida, estando sempre ao meu lado com incentivos a alcançar caminhos cada vez mais distantes.

Aos meus irmãos (as), sobrinhos (as) e cunhados (as) pelo carinho e por todas as mensagens positivas, me dando ânimo para continuar enfrentando todos os obstáculos da minha vida, nos quais confiaram em mim desde sempre. Em geral a toda minha família meus singelos agradecimentos durante este processo.

A minha avó e avô paterno (em memória), avó materna (em memória) e avô materno, que mesmo longe sempre confiaram em mim, no qual sinto um amor imenso e uma grande saudade.

Ao meu amigo, colega e professor Daniel Leonardo Cala Delgado, pela confiança depositada, pela grande ajuda para conquistar este sonho e sem você nada seria possível, gratidão.

Á minha orientadora Profa. Dra. Julieta Rodini Engracia de Moraes, pela confiança ao me permitir fazer parte da sua equipe, pela sua dedicação, paciência e carinho.

Aos meus amigos e irmãos de laboratório Jefferson Yunis Aguinaga (Jeff), Victor Alexander Cueva Quiroz (Lex), Fernando Carlos Ramos Espinoza (Fer) e Carlos Casanova Quispe, grato pela grande amizade, pois depositaram a confiança de vocês em mim. Obrigado pela ajuda para concluir este trabalho. Nunca irei esquecer aquela comida boa do Peru e também aquelas viagens maravilhosas nas quais compartilhamos todos juntos.

Meu amigo Maicon Rodrigues, pela ajuda, convivência, força e parceria. Obrigado por me receber em sua casa durante todo este tempo e pela grande aprendizagem um para com o outro.

A todas as pessoas brasileiras e estrangeiras que tive a oportunidade e prazer de conhecê-las no Brasil, onde fiz grandes amizades, algumas delas já foram embora para seu país de origem e as que estão no Brasil. Aos meus amigos do Peru por me acolher como um peruano mais. A todos vocês muito obrigado por compartilhar experiências lindas, pela grande amizade e pelas grandes festas que fazíamos. Espero encontrar todos vocês numa nova oportunidade. Levarei todos em meu coração.

Ao pessoal do Departamento de Patologia Veterinária pelo apoio e momentos compartilhados durante o desenvolvimento do meu trabalho,

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) – Campus de Jaboticabal – SP (Brasil), pela oportunidade concedida de tornar-me Mestre em Aquicultura e também ao seu corpo docente pelo comprometimento, dedicação e conhecimento fornecido que adquiri, que levarei sempre comigo no exercício de minha profissão.

Ao David, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura (CAUNESP/Jaboticabal), pelo suporte durante todo o período do mestrado.

Aos membros da banca examinadora Dr. Marcello Pardi de Castro e Dra. Geovana Dotta Tamashiro pelas valiosas sugestões, realçando e aperfeiçoando ainda mais a utilidade do meu trabalho, tanto na qualificação como na defesa. Obrigado.

Agradeço a todos os funcionários do Caunesp pelo apoio, amizade e ajuda de sempre.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Brasil, pela oportunidade, experiências e conhecimento, espero poder retribuir pelo menos um pouco do que me foi dado.

Muito obrigado a todos que contribuíram para que eu me tornasse quem sou hoje!

APOIO FINANCIERO

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

À Fapesp, pela verba concedida no auxílio regular processo 2018/06137-6, assim como nas bolsas de estudos 2016/18345-2 e 2017/15779-4 aos colaboradores da pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa de estudos do colaborador 141835/2018-4.

RESUMO

A produção de lambaris (*Astyanax* sp.) tem destaque na piscicultura de peixes nativos no Brasil devido ao crescente uso como isca viva e consumo direto como petisco. As pesquisas nesta espécie ainda são insipientes, particularmente na área da sanidade. Relatos de casos e diagnósticos laboratoriais sugerem que a aeromoniose é a principal doença infecciosa nesta espécie. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel de diversos fatores de manejo reprodutivo e da despesca na susceptibilidade de *Astyanax altiparanae* à infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* pelo método de banhos de imersão. Foram avaliados o material das redes de despesca, o sexo, a reversão sexual, a temperatura e o pH da água. A infecção experimental foi induzida por imersão em solução diluída de uma cepa patogênica de *A. hydrophila*. Os sinais clínicos, lesões anatomopatológicas, integridade da pele e a mortalidade foram avaliados durante 12 dias. Com respeito ao uso de diferentes tipos de rede de despesca, a sobrevivência foi significativamente menor e houve severas lesões cutâneas na pele dos peixes manipulados com rede de nylon quando comparados aos grupos com redes de polipropileno, polietileno ou peixes manejados sem rede. Por outro lado, a reversão sexual com estradiol evidenciou sobrevivência menor das fêmeas sobre os machos (ambos tratados com hormônios), e houve tendência ao incremento na mortalidade com a adição do hormônio na ração (2 vs 4 mgkg⁻¹). Com relação à temperatura e o pH da água, registrou-se menor sobrevivência nos grupos mantidos nas temperaturas e pH mais altos. Conclui-se que o método de imersão mostrou-se adequado para reproduzir a infecção com *A.*

hydrophila no lambari de rabo amarelo e que diversos fatores de manejo influenciaram o curso da infecção.

Palavras-chave: Lambaris, Septicemia hemorrágica; Aeromonose; Sanidade aquícola.

ABSTRACT

Yellowtail tetra (*Astyanax* sp) production has a promissory future in native fish farming in Brazil due to the increased use of this species as live bait and for direct consumption. Research on this species is still incipient, particularly in aquatic health, where local reports suggest that aeromoniosis is the major infectious diseases in yellowtail tetra. The present work aimed to evaluate the role of several reproductive and handling factors on the susceptibility of *Astyanax altiparanae* to experimental infection with *Aeromonas hydrophila* by an immersion bath method. The effects of the net material used for handling, sex, sexual reversion, water temperature and pH were evaluated. Experimental infection was achieved by immersion in dilute solution of a pathogenic strain of *A. hydrophila*. Clinical signs, pathological lesions, skin integrity and mortality were evaluated for 12 days. Regarding the different types of net material, the study showed significant lower survival and more severe cutaneous lesions in fish manipulated with nylon net when compared to polypropylene, polyethylene net and managed by hand. In addition, sexual reversion with estradiol revealed lower survival for females over males (both treated with hormones), and there was a tendency to increased mortality rates with the incorporation of hormone in the diet. Regarding water temperature and pH, there was lower survival in the groups maintained at higher temperature and pH. It was concluded that the immersion bath method is a suitable model to reproduce *A. hydrophila* infection

in the yellowtail tetra and that several factors such as the net material, sex, water temperature and pH influence the course of the infection.

Keywords: Lambaris; hemorrhagic septicemia; Aeromoniosis; Aquatic animal health.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Produção aquícola mundial e no Brasil

A produção mundial de peixes registra crescimento constante devido ao aumento da demanda por produtos proteicos de alto valor biológico, sendo os peixes uma das principais fontes de proteína animal. Assim, entre 1961 e 2015, o aumento médio anual do consumo mundial de peixe comestível foi de 3,2% superando o crescimento populacional (1,6%), assim como o crescimento do total de carnes procedentes de animais terrestres consumidas no mundo (2,8%) (FAO, 2018). Em termos per capita, o consumo de peixe teve um aumento de 0.009 toneladas em 1961 para 0.202 toneladas em 2015 (FAO, 2018).

No Brasil, a produção piscícola cresceu 8% em 2017, encerrando o ano com 691.700 toneladas de peixes cultivados (PEIXE BR, 2018). Estima-se que esta atividade crescerá em 104,4% até o ano 2025, alcançando 1,15 milhões T produzidas por ano. O cultivo de peixes nativos representa 43,7% da produção brasileira (PEIXE BR, 2018), com expectativa de crescimento elevada respaldada pelos recentes investimentos na área. Dentre as principais espécies nativas cultivadas encontram-se os peixes redondos (pacus, tambaquis, pirapitingas, patingas), pirarucus, surubim (cacharas, pintados e híbridos) (IBG, 2018) e os lambaris, os quais apresentaram recentemente aumento

considerável na sua produção passando de 0.234711 toneladas em 2016 a 0.595607 toneladas em 2018 (IBG, 2018).

1.2 Lambari como espécies de produção

Lambari é o nome comum para diferentes espécies do gênero *Astyanax*, da família Characidae (GÉRY, 1977), amplamente distribuídos na região neotropical desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (ABILHOA, 2007; FROESE & PAULY, 2018). A espécie mais desenvolvida para a aquicultura no Brasil é *Astyanax altiparanae*, também conhecido por lambari do rabo amarelo (GARUTTI & BRITSKI, 2000).

1.3 Características produtivas do lambari

No Brasil, estes peixes são comumente utilizados como iscas vivas em pesque e pagues por pescadores de espécies carnívoras (DA SILVA et al., 2011). Os mesmos também são consumidos diretamente como petiscos em diversas regiões do país (FIRETTI et al., 2013). Adicionalmente, o lambari apresenta grande importância ecológica, contribuindo para o equilíbrio dos ecossistemas de água doce brasileiros (SHIBATTA et al. 2002).

Durante o cultivo de *A. altiparanae*, as fêmeas tendem a crescer mais do que os machos, o que torna a produção monosssexual viável, embora ainda não seja aplicada comercialmente (VALLADÃO et al., 2018). Antes que o uso em larga escala do cultivo monossexo seja estabelecido, é importante determinar que características indesejáveis não estejam incluídas no peixe monossexo (PETERSON & DAVIS, 2012). Diferenças na resposta imune e consequente suscetibilidade às doenças entre machos e fêmeas no lambari são desconhecidas, entretanto o sexo é um importante fator que influencia o sistema imunológico dos peixes. Estrógenos e andrógenos desempenham

papel importante na homeostase hematológica por mediar a proliferação de linfócitos (MILLA et al., 2011; MAGNADOTTIR, 2010).

1.4 Pesquisas no lambari

O interesse pela criação comercial desta espécie, favoreceu o desenvolvimento de pesquisas, para viabilizar e tecnificar sua produção, principalmente nas áreas de nutrição (BARBIERI, 1992; GONÇALVES et al., 2014; SUSSEL et al., 2014.), toxicologia (SILVA et al., 2010), reprodução (CASSEL et al., 2017), genética (LEUZZI et al., 2004) e manejo (GIMBO et al., 2008). Porém, apesar deste interesse, são escassos os estudos referentes à sanidade na produção de lambaris, sendo estes mais focados à identificação de parasitas (BARASSA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2007; CAMARGO et al., 2016), sem maiores relatos científicos de outros tipos de agentes infecciosos que atingem sua produção.

1.5 Doenças na piscicultura

Na última década, houve aumento exponencial de enfermidades emergentes na aquicultura mundial, causando perdas econômicas numa ampla variedade de peixes marinhos e de água doce (SOTO et al., 2009). Os peixes de criação são constantemente expostos aos vários procedimentos de manejo como sujeição, biometria, transporte, exposição ao ar e confinamento que podem comprometer a homeostase do organismo (DROR et al., 2006). No Brasil, os surtos de doenças mais frequentemente registrados nos peixes tropicais de cultivos são causados por bactérias Gram-negativas (*Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Francisella*) e bactérias Gram-positivas (*Streptococcus* e *Lactococcus*) (PILARSKI et al., 2008; TAVARES et al., 2018). Estas bacterioses atingem vários peixes como tilápias (FIGUEIREDO et al.,

2005; CARVALHO-CASTRO et al., 2010; NETTO et al., 2011; SALVADOR et al., 2013; LEAL et al., 2014) e peixes nativos (PILARSKI et al., 2008; EVANS et al., 2009; SILVA et al., 2012; SEBASTIÃO et al., 2015; TAVARES et al., 2018).

1.6 Fatores predisponentes às bacterioses na piscicultura

Ao longo do período de criação, os peixes são submetidos às diferentes formas de manejo e múltiplas variações ambientais. Muitos são os fatores que, individualmente ou em conjunto, podem impor estresse no sistema fisiológico dos peixes comprometendo o sistema imune, aumentando a incidência às doenças (ADAMS, 1990). Estes fatores podem ser categorizados como ambientais (temperatura, salinidade, amônia, oxigênio dissolvido, pH, produtos químicos, patógenos), físicos (limpeza, classificação, manuseio, aglomeração, confinamento, alimentação, vacinação) e sociais (competição, aglomeração, agressividade) (IWAMA et al., 2005; PAVLIDIS & MYLONAS, 2011; TORT, 2011; BRAITHWAITE & EBBESSON, 2014).

1.7 Temperatura da água

O estresse ambiental é uma das principais causas predisponentes a infecções bacterianas na piscicultura (MARTINS et al., 2009). Esses surtos podem estar associados às mudanças rápidas na temperatura da água, que favorecem a proliferação bacteriana (MARCOGLIESE, 2010) e diminuem a resistência do hospedeiro (HARVELL et al., 2002; HOOPER et al., 2007). Peixes fora da zona de conforto de temperatura são mais susceptíveis às infecções bacterianas. Estudos feitos com tilápias indicam que a temperatura da água influencia as taxas de mortalidade causadas por *Streptococcus spp.* e estão associados às altas temperaturas da água como observado em *Oreochromis mossambicus* desafiadas com *Streptococcus iniae* mantidas sob diferentes temperaturas 19, 23, 27, 31 e 35 ° C. No citado estudo, observou-se

que peixes transferidos de temperaturas de 27° C para as mais altas apresentaram menor resistência à infecção e diminuição nos parâmetros da imunidade inata tais como contagem leucocitária total, burst respiratório, atividade da lisozima sérica e atividade fagocítica das células sanguíneas (NDONG et al., 2007). Marcusso et al., (2015) testaram a influência de diferentes temperaturas da água: 24, 26, 28 e 32° C no curso da infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo, revelando maior mortalidade nos peixes mantidos nas temperaturas mais altas. Na mesma linha, pacus, *Piaractus mesopotamicus* desafiados experimentalmente com *A. hydrophila* sob diferentes temperaturas: 21, 22 e 23°C após suplementação alimentar com vitaminas C e E apresentaram maior mortalidade na temperatura mais alta, mesmo com suplementação alimentar (GARCIA et al., 2009).

1.8 pH da água

O pH é um parâmetro importante a ser monitorado dentro de uma produção visto que possui efeito direto sobre o metabolismo e os processos fisiológicos de peixes e outros organismos aquáticos. Quando os valores de pH se encontram fora do desejável para a espécie, pode ser desencadeada uma situação de estresse, com a subsequente queda da imunidade, supressão do crescimento e em casos extremos, a morte (SAMPATH et al., 1993; COPATTI & AMARAL, 2009; BALDISSEROTO, 2011). Mudanças bruscas no pH da água de cultivo dos peixes são decorrentes do uso excessivo de ração ou suplementação alimentar, produção excessiva de desperdícios pelos peixes (esterco) ou uso indiscriminado de fertilizantes orgânicos (SINGH et al., 2019). A maioria dos peixes de cultivo vivem em uma faixa de pH muito estreita próxima da neutralidade, sendo o pH ótimo para o cultivo de espécies comerciais como as carpas níveis de entre 7,0 a 8,5 (JENSEN & BRAHM,

1995; QIAN et al., 2014; CHEN et al., 2015). Segundo Das et al., (2006), alterações no pH na água de cultivo pode afetar o funcionamento branquial, o que prejudica o equilíbrio osmótico e a respiração dos peixes. A exposição a pH ácido tem como primeira resposta o aumento da secreção de muco pelas brânquias, induzindo fusão lamelar, e diminuindo a capacidade respiratória e de trocas de íons (MUNSHI & SINGH, 1992). Enquanto que, peixes expostos a ambientes de pH alcalino, podem sofrer distúrbios no fluxo interno de Na^+ e Cl^- devido a inibição nas trocas de Na^+ / H^+ , $\text{Na}^+ / \text{NH}_4$ e $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3$ nas brânquias (WILKIE et al., 1996; WOOD, 2001).

1.9 Sexo e reversão sexual

Outro fator modulador do curso das doenças é o sexo e a reversão sexual dos peixes. Fêmeas e machos diferem no consumo de energia e requerimentos nutricionais produto das interações com fatores ambientais e hormônios sexuais (TOGUYENI et al., 1997). Diferenças marcadas no gasto energético são observáveis entre machos e fêmeas (LUPATSCH et al., 2010). Estas diferenças são decorrentes de processos reprodutivos como o processo de maturação de ovócitos nas fêmeas, o qual incrementa o gasto de energia e nutrientes para a produção de componentes como o saco vitelino e vitelogenina (VOLKOFF & LONDON, 2018). Assim, o gasto energético no processo reprodutivo, pode atuar em detrimento de outras funções como as do sistema imune.

Por outro lado, os hormônios sexuais atuam como importantes moduladores da resposta imune (HARRIS & BIRD 2000; SHELLEY et al., 2013). Estes são utilizados na aquicultura como técnicas de reversão sexual para a obtenção de peixes do mesmo sexo com objetivo de aumentar o potencial produtivo de determinadas espécies, sendo utilizado para este fim o

tratamento com estradiol, estrógeno que atua na diferenciação sexual e mudanças de sexo, estimulando o desenvolvimento do tecido ovarino (NAKAMURA et al., 2003; PORTO-FORESTI et al., 2005; SATO et al., 2006. Estudos *in vivo* e *in vitro* em diversas espécies de teleósteos relatam funções imunossupressoras associadas ao estradiol tais como inibição da quimiotaxia e da atividade fagocítica de leucócitos (CHAVES-POZO, 2018).

1.10 Rede de despesca

O uso de redes de despesca seja para troca de tanque, seleção, biometria, transporte ou despesca final pode resultar em diferentes graus de lesões na pele dos peixes, aumentando a probabilidade de infecções por fungos e bactérias (CONTE, 2004; COLOTELO & COOKE, 2011). A captura é, provavelmente, uma das etapas mais agressivas do manejo em uma piscicultura onde o exercício de fuga por parte dos animais, é um componente inevitável, além da abrasão do corpo do animal contra outros peixes ou contra as redes, que podem acarretar mortalidade significativa dos lambaris, devido às lesões, estresse e doenças causadas durante a manipulação das redes de arrasto (PORTO-FORESTI et al., 2001). Estas lesões na pele muitas vezes não são percebidas pelo operário, tornando-se portas de ingresso para agentes infecciosos.

O material da malha das redes de captura pode variar muito, embora os tipos mais comuns usados na pesca e na aquicultura são o nylon, borracha, polipropileno e polietileno (LIZÉE et al., 2017). O tipo de material da malha influencia a severidade dos ferimentos com a rede. Gallardo et al., (2010), utilizaram fêmeas de *Tinca tinca* para avaliar os efeitos de dois tipos de material de rede de despesca (rede de nylon e rede têxtil macia) durante o confinamento por 24h, evidenciando que o nylon induziu danos à pele e

barbatanas mais severos. Estudos análogos de menor duração (30 s) também mostraram que o nylon induz injúrias cutâneas mais severas que rede de borracha ou polipropileno, além de perda de muco do corpo dos animais (BARTHEL et al., 2003; LIZÉE et al., 2017). Contudo, a maioria dos estudos referentes ao material da rede referem-se a pesca esportiva do tipo pesque e solte sendo cada vez mais questionada pela preocupação com o bem-estar dos peixes com base no argumento da imposição desnecessária de dor e sofrimento aos animais (HUNTINGFORD et al. 2006, ARLINGHAUS et al. 2009). Esta é uma prática com tempos de retenção longos, enquanto que procedimentos mais curtos próprios da aquicultura como inspeção de rotina, biometria e seleção dos peixes tem sido pouco estudados.

Os danos na pele induzidos pelo manejo com rede, costumam ser visíveis e portanto facilmente identificados, no entanto, a pele do peixe pode ficar com úlceras sem exibir sinais óbvios de dano (COLOTELO & COOKE, 2011). Uma das formas de detectar lesões de pele antes de serem visíveis ao olho nu é mediante o uso de um corante vital denominado fluoresceína. Este corante é amplamente utilizado em procedimentos oftalmológicos em mamíferos, principalmente por via intravenosa (MINTERN et al, 1999). A fluoresceína é um corante amarelo não tóxico com alto grau de ionização em pH fisiológico; que não ingressa no epitélio intacto nem forma vínculo com o tecido, mas quando há quebra na barreira epitelial pode se ligar aos tecidos (BARTLETT et al, 1996). Esse corante foi usado para detectar danos na pele de peixes em espécies de criação como truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), peixe-gato (*Ictalurus punctatus*), e kinguio (*Carassius auratus*) com lesões cirúrgicas induzidas na pele (NOGA & UDOMKUSONSRI, 2002), assim como

peixes de pesca esportiva de água doce como o robalo (*Micropterus salmoides*) e o lúcio do norte (*Esox lucius*) com lesões após retenções curtas e prolongadas por manejo com rede (COLOTELO & COOKE, 2011, 2012) e em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados experimentalmente com *A. hydrophila* (MARCUSO et al., 2014).

1.11 Gênero *Aeromonas*

Espécies do gênero *Aeromonas* são habitantes comuns de ambientes aquáticos, que pertencem à família Aeromonadaceae (COLWELL et al., 1986; YÁÑEZ et al., 2003). Podem atuar como agentes oportunistas e são descritas em surtos de doenças de peixes e em doenças humanas (ALTWEGG, 1999; FIGUERAS, 2005; SAAVEDRA et al., 2004).

As bactérias deste gênero podem ser responsáveis por zoonoses pelo contato direto com muco e tecidos de peixes infectados com manifestações clínicas da doença ou assintomáticos. Cortes e escoriações presentes nas mãos do manipulador servem como porta de ingresso para a bactéria (LOWRY & SMITH, 2007). Infecções humanas com *Aeromonas* spp. se desenvolvem frequentemente em pessoas imunocomprometidas para as quais a bacteremia pode ser uma ameaça severa à vida (TSAI et al., 2006; IGBINOSA et al., 2012). Em pessoas saudáveis, os sinais mais comuns da infecção por *Aeromonas* spp. incluem inchaço localizado da ferida e gastroenterite (MOYER, 1987; VINH & EMBIL, 2007; SOOD & NERURKAR, 2014).

1.12 *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila é uma das espécies mais importantes do gênero *Aeromonas*, conhecida na aquicultura por infectar peixes e ocorrer de forma ubíqua e autóctone em ambientes aquáticos (PACHANAWAN et al 2008). Inicialmente, não recebeu maior importância como patógeno de peixes, já que

a bactéria é parte integrante da microbiota intestinal de peixes saudáveis (TRUST et al., 1974). Não obstante, *A. hydrophila* é um patógeno oportunista de grande variedade de hospedeiros, e, lesões cutâneas prévias facilitam o ingresso do patógeno (VENTURA & GRIZZLE, 1988).

A bactéria é do tipo bastonete móvel com flagelos polares, que não produz esporos, Gram-negativa, não capsulada, aeróbia ou anaeróbia facultativa, apresenta mecanismo oxidativo e fermentativo para a redução da D-glucose (STOSKOPF, 1993; COLWELL et al., 1986; BULLER, 2014). Sua distribuição geográfica é ampla, podendo ser encontrada em muitos nichos ecológicos, principalmente em águas, seja de rios, lagos poluídos ou não, ambientes piscícolas como tanques rede e viveiros, além disso até mesmo em águas levemente salinas (PALUMBO et al., 2001; SUHET et al., 2011).

A. hydrophila atinge grande variedade de espécies de peixes incluindo a carpa comum, *Cyprinus carpio* (KARUNASAGAR et al., 1991; ISWARYA et al., 2018), tilápia, *Oreochromis niloticus* (YAMBOT, 1998), enguia, *Anguilla anguilla* (ESTEVE et al., 1993) e kinguio, *Carassius auratus* (MAJI et al., 2006), entre outros. Nas pisciculturas brasileiras surtos de enfermidade por *A. hydrophila* ocorrem com frequência em espécies como surubim híbrido (SILVA et al., 2012) e pacus (BELÉM-COSTA & CYRINO, 2006).

1.13 Aeromonose no lambari

A infecção pela bactéria *A. hydrophila* desencadeia septicemia hemorrágica em teleósteos tropicais e provou ser virulenta para *Astyanax bimaculatus* espécie do mesmo gênero do lambari (JATOBÁ et al., 2017). Descrições científicas de patógenos bacterianos no cultivo do lambari são escassas, porém relatos de piscicultores e diagnósticos laboratoriais permitiram caracterizar que os problemas mais comuns na lambaricultura estão

associados às doenças bacterianas indutoras de septicemia hemorrágica (VALLADÃO et al., 2018).

1.14 Fatores de virulência e fatores predisponentes à infecção

Dentre dos fatores de virulência de *A. hydrophila*, encontram-se as endotoxinas, enterotoxinas extracelulares, hemolisinas, citotoxinas e proteases, assim como a capacidade de se aderir às células por meio de proteínas de membrana (HOWARD & BUCKLEY, 1985; THOMAS, 2013). A aerolisina é um fator de virulência frequentemente encontrado nas cepas isoladas de surtos de doenças (OLIVEIRA et al., 2011; LAITH & NAJIAH, 2013). Lipases e hidrolipases são importantes fatores de virulência em *Aeromonas* spp., pois alteram a estrutura da membrana citoplasmática do hospedeiro, exacerbando sua patogenicidade, principalmente se o gene da aerolisina estiver presente (NAWAZ et al., 2010).

1.15 Prevenção à infecção

Surtos de septicemia por *Aeromonas* geralmente acometem peixes imunos-suprimidos produto do efeito de estressores tais como temperatura, superlotação, poluição orgânica e hipóxia (ANUSHA et al., 2014). Por tanto, medidas de prevenção são importantes para evitar doenças bacterianas, tais como, manter as densidades adequadas nos viveiros, evitar a manipulação excessiva dos peixes, manter os parâmetros de qualidade da água ótimas, entre outros. Adicionalmente, o uso de imunoestimulantes incorporados na ração de maneira profilática, podem beneficiar a saúde dos animais principalmente nas fases iniciais do cultivo, onde os peixes são mais susceptíveis a doenças (PORTZ, 2006).

1.16 Sinais clínicos e alterações anatomopatológicas

A. hydrophila causa septicemia hemorrágica, caracterizada por erosões na pele, brânquias, opérculos e nadadeiras, progredindo para ulcerações com perdas do epitélio e hemorragia. Também, a aeromonose é caracterizada pela distensão abdominal. Internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, e lesões necrohemorrágicas no fígado e rim (GARCIA et al., 2009; AUSTIN & AUSTIN, 2012). O fígado dos animais pode estar pálido ou possuir cor esverdeada, enquanto o rim apresenta aspecto inflamado e friável (AFIFI et al., 2000).

Infecções sistêmicas por *A. hydrophila* em bagres do canal, *Ictalurus punctatus*, caracterizaram-se por necrose difusa em vários órgãos internos, com aumento de melanomacrófagos, sendo o fígado e os rins os órgãos alvo da septicemia aguda (VENTURA & GRIZZLE, 1988). Em estudo feito por Marinho-Neto et al., (2019) foram caracterizadas as fases iniciais da infecção por *A. hydrophila* em diferentes tecidos de pacus injetados por via intraperitoneal com a bactéria, observando-se lesões histopatológicas 6 a 9 horas após da inoculação em todos os órgãos, além de hemorragia, necrose extensa com infiltrado de leucócitos e congestão de grandes vasos.

Lesões similares foram observadas em tilápias do Nilo, incluindo hemorragia sub capsular renal, degeneração intersticial do parênquima renal com formação vacuolar citoplasmática e necrose epitelial tubular associada a infiltrado intersticial linfocítico (YARDIMCI & AYDIN, 2011).

1.17 Tratamento da doença

O tratamento da aeromoniose em peixes é realizado principalmente mediante administração de antimicrobianos na ração (SINDAN, 2018). Na aquicultura comercial brasileira os antimicrobianos mais usados são a

oxitetraciclina e o florfenicol, sendo os únicos autorizados para o uso em peixes segundo portaria N° 444 de dezembro de 2014 (MPA, 2014).

Antibióticos como cloranfenicol, florfenicol, estreptomicina, oxitetraciclina e ampicilina apresentam eficácia no tratamento (WOOLEY et al., 2004; YOSHIMIZU et al 2016). Não obstante, recentes pesquisas de sensibilidade antimicrobiana de isolados da *A. hydrophila* em peixes, têm mostrado aparição de resistência antimicrobiana contra os principais produtos aplicados na aquicultura, o que dificulta o tratamento da doença (RADU et al., 2003; STRATEV & ODEYEMI 2016).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILHOA, V. Natural history aspects of *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) in an Araucaria Forest stream in southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 4, p. 997-1005, 2007.

ADAMS, S. M. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. [Formerly used by DOE/TIC for titles for which valid CODEN was not available. Now invalid] 92-DEC-15;(Country unknown/Code not available), 8.1990.

AFIFI, S. H.; AL-THOBIATI, S.; HAZAA, M. S. Bacteriological and histopathological studies on *Aeromonas hydrophila* infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from fish farms in Saudi Arabia. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 42, n. 84, p. 195-205. 2000.

ALTWEGG, M. **Aeromonas and Plesiomonas**. In Manual of Clinical Microbiology, 7th edn, pp. 507–516. Edited by MURRAY, P. R., BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. WASHINGTON, D. C. American Society for Microbiology, 1999.

ANUSHA, P.; THANGAVIJI, V.; VELMURUGAN, S.; MICHAELBABU, M.; CITARASU, T. Protection of ornamental gold fish *Carassius auratus* against *Aeromonas hydrophila* by treating *Ixora coccinea* active principles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, p. 485-493, 2014.

ARLINGHAUS, R.; COOKE, S. J.; SCHWAB, A.; COWX, I. G. A pragmatic and a suffering-centred approach to fish welfare. **Journal of Fish Biology**, 75: 2448–2463. 2009.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Springer. Heidelberg, German, 2012.

AZEVEDO, G. B.; MADI, R. R.; UETA, M. T. Metazoários parasitas de *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) na Fazenda Rio das Pedras, Campinas, SP, Brasil. **Títulos não-correntes**, v. 21, n. 2, 2012.

BALDISSEROTO, B. Water pH and hardness affect growth of freshwater teleosts. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40, 138-144. (supl. especial).2011.

BARASSA, B.; CORDEIRO, N. S.; ARANA, S. A new species of Henneguya, a gill parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with comments on histopathology and seasonality. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 761-765, 2003

BARBIERI, G. Nutritional dynamics of *Astyanax scabripinni paranae* (Characiformes, Characidae) from Fazzari stream. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 21, 1992.

BARTHEL, B. L.; COOKE, S. J.; SUSKI, C. D.; PHILIPP, D. P. Effects of landing net mesh type on injury and mortality in a freshwater recreational fishery. **Fisheries Research**, v. 63, n. 2, p. 275–282, 2003. doi: 10.1016/S0165-7836(03)00059-6.

BARTLETT, J. D.; GHORMLEY, N. R.; JAANUS, S. D.; ROWSEY, J. J.; ZIMMERMAN, T. J. Ophthalmic dyes. Ophthalmic drug facts. Facts and comparisons Wolters Kluwer Co., St. Louis, MO, 1996.

BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J. E. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, 63(3), 281-284.. 2006.

BRAITHWAITE, V.; EBBESSON, L. Pain and stress responses in farmed fish. **Revue Scientifique et Technique: Office International des Epizooties**, v. 33, p. 245–253. 2014.

BULLER, N. B. Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI, 2014.

CHAVES-POZO, E.; GARCÍA-AYALA, A.; CABAS, I. Effects of sex steroids on fish leukocytes. **Biology**, v. 7, n. 1, p. 9, 2018.

CAMARGO, A. D. A.; NEGRELLI, D. C.; PEDRO, N. H. O.; AZEVEDO, R. K. D.; SILVA, R. J. D.; ABDALLAH, V. D. Metazoan parasite of lambari *Astyanax altiparanae*, collected from the Peixe river, São Paulo, southeast of Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 876-880, 2016.

CARVALHO-CASTRO, G. A.; LOPES, C. O.; LEAL, C. A.; CARDOSO, P. G.; LEITE, R. C.; FIGUEIREDO, H. C. Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 144, p. 371-376, 2010.

CASSEL, M.; CHEHADE, C.; BRANCO, G. S.; CANEPPELE, D.; ROMAGOSA, E.; BORELLA, M. I. Ovarian development and the reproductive profile of

Astyanax altiparanae (Teleostei, Characidae) over one year: Applications in fish farming. **Theriogenology**, v. 98, p. 1-15, 2017.

CHEN, Y. Y.; CHEN, J. C.; TSENG, K. C.; LIN, Y. C.; HUANG, C. L. Activation of immunity, immune response, antioxidant ability, and resistance against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* decrease under long-term culture at low pH. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 2, p. 192-199, 2015.

CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3-4, p. 205-223, 2004. doi: 10.1016/j.applanim.2004.02.003

COLOTELO, A. H.; COOKE, S. J. Evaluation of common angling-induced sources of epithelial damage for popular freshwater sport fish using fluorescein. **Fisheries Research**, v. 109, n. 2-3, p. 217-224, 2011. doi: 10.1016/j.fishres.2010.12.005

COLOTELO, A. H.; COOKE, S. J.; BLOUIN-DEMERS, G.; MURCHIE, K. J.; HAXTON, T.; SMOKOROWSKI, K. E. Influence of water temperature and net tending frequency on the condition of fish bycatch in a small-scale inland commercial fyke net fishery. **Journal for Nature Conservation**, v. 21, n. 4, p. 217-224, 2013.

COLWELL, R. R.; MAC DONELL, M. T.; DE LEY, J. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 3, p. 473–477, 1986.

COPATTI, C.E.; AMARAL, R. Osmorregulação em juvenis de piava, *Ieporinus obtusidens* (characiformes: anastomidae), durante trocas do pH da água. **Biodiversidade Pampeana**, 7(1): 1-6. 2009.

DA SILVA, N. J. R.; LOPES, M. C.; FERNANDES, J. B. K.; HENRIQUES, M. B. Caracterização dos sistemas de criação e da cadeia produtiva do lambari no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, 41(9), 17-28. 2011.

DAS, P. C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J. K. Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 80-87, 2006.

DROR, M.; SINYAKOV, M. S.; OKUN, E.; DYM, M.; SREDNI, B.; AVTALION, R. R. Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 3-4, p. 279-287, 2006. doi:10.1016/j.vetimm.2005.08.022.

ESTEVE, C.; BIOSCA, E. G.; AMARO, C. Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared in fresh water. **Diseases of aquatic organisms**, 16(1), 15-20. 1993.

EVANS, J. J.; KLESIUS, F. H.; SHOEMAKER, C. A. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 943– 951, 2009.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. FAO: Rome. 2018.

FIGUEIREDO, H. C.; KLESIUS, P. H.; ARIAS, C. R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C. A.; PEREIRA, D. J.; PEIXOTO M. T. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, n. 4, p. 199-204, 2005.

FIGUERAS, M. J. Clinical relevance of *Aeromonas* SM503. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 145-153, 2005.

FIRETTI, R.; DE LIMA ASTOLPHI, J.L.; GARCIA, S.M. Aquisição de pescados para consumo domiciliar na região sudeste: análise a partir da pesquisa de orçamentos familiares. **Revista de Economia Agrícola**, v. 60, n. 1, p. 17-30, 2013.

FROESE, R.; PAULY, D. Editors FishBase. World Wide Web electronic 78 publication, 2018. Disponível em: <http://www.fishbase.org>, version 10/2018.

GALLARDO, J. M.; ALAVI, S. M. H.; ADÁMEK, Z.; DROZD, B. External damage and changes in blood parameters in female tench, *Tinca tinca* (L.) retained in anglers' keepnets. **Reviews in fish Biology and Fisheries**, v. 20, n. 3, p. 403-408, 2010. doi: 10.1007/s11160-009-9149-7

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

GARUTTI, V.; BRISTKI. H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS Série Zoologia**, v. 13, p. 65-88, 2000.

GÉRY, J. **Characoids of the World**. TFH Publications: Neptune, New Jersey, USA, 1977.

GIMBO, R.Y.; SAITA, M.V.; GONÇALVES, A.F.N.; TAKAHASHI, L.S. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-raboamarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 2, p. 350-357, 2008.

GONÇALVES, L.U.; PARISI, G.; BONELLI, A.; SUSSEL, F. R.; VIEGAS, E. M. M. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 2, p. 195-203, 2014.

HARRIS, J.; BIRD, D. J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 77, n. 3-4, p. 163-176. 2000.

HARVELL, C. D.; MITCHELL, C. E.; WARD, J. R.; ALTIZER, S.; DOBSON, A. P.; OSTFELD, R. S. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2158-2162, 2002.

HOOVER, C.; DAY, R.; SLOCOMBE, R.; HANDLINGER, J.; BENKENDORFF, K. Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 4, p. 363-379, 2007.

HOWARD, S. P.; BUCKLEY, J. T. Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 1, p. 336-340, 1985.

HUNTINGFORD, F.A., ADAMS, C., BRAITHWAITE, V.A., KADRI, S., POTTINGER, T. G., SANDO E, P. AND TURNBULL, J. F. Current issues in fish welfare. **Journal of Fish Biology**, 68: 332–372. 2006.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção da pecuária municipal 2017**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 45, p. 1-8, 2017.

IGBINOSA, I. H.; IGUMBOR, E. U.; AGHDASI, F.; TOM, M.; OKOH, A. I. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. **The Scientific World Journal**, 2012.

IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O. B.; VIJAYAN, M. M. **Stress in fishes**. In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.), *The Physiology of Fishes*, third ed. Taylor and Francis, Boca Raton, FL, pp. 319–342, 2005.

ISWARYA, A.; VASEEHARAN, B.; ANJUGAM, M.; GOBI, N.; DIVYA, M.; FAGGIO, C. β -1, 3 glucan binding protein based selenium nanowire enhances the immune status of *Cyprinus carpio* and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & shellfish immunology**, 83, 61-75. 2018.

JATOBÁ, A.; MORAES, A. V.; STECKERT, L. D.; JESUS, G. F. A. Selection of autochtone probiotic for *Astyanax bimaculatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1645-1652, 2017. doi: 10.1590/1678-4162-9158

JENSEN, F.; BRAHM, J. E. S. P. E. R. Kinetics of chloride transport across fish red blood cell membranes. **Journal of experimental biology**, v. 198, n. 10, p. 2237-2244, 1995.

KARUNASAGAR, I.; ROSALIND, G.; KARUNASAGAR, I. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. **Journal of Fish Diseases**, 14(3), 413-417. 1991.

LAITH, A. R.; NAJIAH, M. *Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2013.

- LEAL, C. A. G.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 5704-5712, 2014.
- LEUZZI, M. S. P.; ALMEIDA, F. S. D.; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 355-362, 2004.
- LIZÉE, T. W.; LENNOX, R. J.; WARD, T. D.; BROWNSCOMBE, J. W.; CHAPMAN, J. M.; DANYLCHUK, A. J.; NOWELL, L. B.; COOKE, S. J. Influence of Landing Net Mesh Type on Handling Time and Tissue Damage of Angled Brook Trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 38, n. 1, p. 76-83, 2018. doi: 10.1002/nafm.10033
- LOWRY, T.; SMITH, S. A. Aquatic zoonoses associated with food, bait, ornamental, and tropical fish. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 6, p. 876-880, 2007.
- LUPATSCH, I.; DESHEV, R.; MAGEN, I. Energy and protein demands for optimal egg production including maintenance requirements of female tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 763-769, 2010.
- MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Marine biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 361-379, 2010.
- MAJI, S.; MALI, P.; JOARDAR, S. N. Immunoreactive antigens of the outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* (Linn.). **Fish & Shellfish Immunology**, 20(4), 462-473. 2006.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção. PORTARIA Nº 444, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2014. Diário Oficial da União de 18 de dezembro de 2014.

MARCOGLIESE, D. J. The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals. OIE **Revue Scientifique et Technique**, v. 27, p. 467-484, 2010.

MARCUSSO, P.F.; YUNIS, J.; CLAUDIANO, G.S.; MANRIQUE, W.G.; SALVADOR, R.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Sodium fluorescein for early detection of skin ulcers in *Aeromonas hydrophila* infected *Piaractus mesopotamicus*. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 34, n. 3, p. 102-106, 2014.

MARCUSSO, P. F.; AGUINAGA, J.Y.; CLAUDIANO, G. S.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MELLO, H.; MARINHO NETO, F. A.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Influence of temperature on *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 57-62, 2015.

MARINHO-NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVA-QUIROZ, V. A.; KOBASHIGAWA, K. K.; CRUZ, N. R.; MORAES, R. F.; MORAES, J. R. Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. **PloS one**, v. 14, n. 9, e0222626, 2019.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; TAVARES-DIAS, M.; FENERICK, J. R. J.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x

Colossoma macropomum female) (Osteichthyes). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69. p. 957-962, 2009.

MILLA, S.; DEPIEREUX, S.; KESTEMONT, P. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. **Ecotoxicology**, 20(2), 305-319.2011.

MINTERN, J.; LI, M.; DAVEY G.M.; BLANAS, E.; KURTS, C.; CARBONE, F.R.; HEATH W.R. The use of carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester to determine the site, duration and cell type responsible for antigen presentation in vivo. **Immunology and Cell Biology**, v. 77, p. 539–543, 1999.

MOYER N. P. Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 2044– 2048, 1987.

MUNSHI, J.S.D.; SINGH, A. Scanning electron microscopic evaluation of effects of low pH on gills of *Channa punctata* (Bloch). **Journal of fish biology**, 41(1), 83-89. 1992.

NAKAMURA, M.; BHANDARI, R. K.; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, 28(1-4), 113-117. 2003.

NAWAZ, M.; KHAN, S. A.; KHAN, A. A.; SUNG, K.; TRAN, Q.; KERDAHI, K.; STEELE, R. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. **Food microbiology**, v. 27, n. 3, p. 327-331, 2010.

NOGA, E. J.; UDOMKUSONSRI, P. Fluorescein: a rapid, sensitive, nonlethal method for detecting skin ulceration in fish. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p. 726-731, 2002. doi: 10.1354/vp.39-6-726

NDONG, D.; CHEN, A.A.; LIN, Y.H.; VASEEHARAN, B.E.; CHEN, J.C. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. **Fish & Shellfish Immunology**, v 22, n. 6, p. 686-694, 2007.

NETTO, L. N.; LEAL, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicaemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 34, n. 3, p. 251-254, 2011.

OLIVEIRA, S. R.; SOUZA, R. T. Y. B.; BRASIL, E. M.; ANDRADE, J. I. A.; NUNES, É. S. S.; ONO, E. A.; AFFONSO, E. G. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 321-326, 2011.

PACHANAWAN, A.; PHUMKHACHORN, P.; RATTANACHAIKUNSOPON, P. Potential of *Psidium guajava* supplemented fish diets in controlling *Aeromonas hydrophila* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 106, n. 5, p. 419-424, 2008.

PALUMBO, S.; ABEYTA, C.; STELMA, G.; WESLEY, I. W.; WEI, C.; KOBERGER, J. A.; ... & MURANO, E. A. **Aeromonas, Arcobacter, and Plesiomonas**. In DOWNES, FP & ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, v. 4, p. 283-290, 2001.

PAVLIDIS, M.; MYLONAS, C. Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and Other Species. John Wiley & Sons. (Eds.), 2011.

PEIXE BR. Anuário peixe br da piscicultura 2019: Brasil, 2019. Disponível em: Acesso em: 15 maio 2019.

PETERSON, B. C.; DAVIS, K. B. Effects of gender and sex hormones on disease susceptibility of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of the**

World Aquaculture Society, v. 43, n. 5, p. 733-738, 2012. doi: 10.1111/j.1749-7345.2012.00588.x

PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 409- 414, 2008.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, v 11, n. 67, p. 15-19, 2001.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). IN: Espécies nativas para piscicultura. Santa Maria: Ed UFMS, 2005.

PORTZ, L. Recentes Avanços na ImunoNutrição de Peixes. In: SILVA-SOUZA, A.T. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá: ABRAPOA. p.229-236. 2006.

QIAN, Z.; LIU, T.; LIU, Q.; HE, S.; LIU, Y.; HOU, F.; LIU, X. P53 is involved in shrimp survival via its regulation roles on MnSOD and GPx in response to acute environmental stresses. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 159, p. 38-51, 2014.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 261-266, 2003.

SAAVEDRA, M. J.; GUEDES-NOVAIS, S.; ALVES, A.; REMA, P.; TACÃO, M.; CORREIA, A.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **International microbiology**, v. 7, n. 3, p. 207-211, 2004.

SALVADOR, R.; CLAUDIANO, G. S.; LOUREIRO, B. A.; MARCUSO, P. F.; ETO, S. F.; PILARSKI, F.; TOAZZA, C. S.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Desempenho e hematologia de tilápias-do-nilo alimentadas com *Saccharomyces cerevisiae* e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 892-898, 2013.

SAMPATH, T.K.; RASHKA, K.E.; DOCTOR, J.S.; TUCKER, R.F.; HOFFMANN, F.M.; Drosophila transforming growth factor superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.** 90(13): 6004-6008. (Export to RIS). 1993.

SATO, Y; SAMPAIO, E.V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, p. 267- 273, 2006.

SEBASTIÃO, F. A.; FURLAN, L. R.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 409. 2015.

SHELLEY, L. K.; OSACHOFF, H. L.; VAN AGGELEN, G. C.; ROSS, P. S.; KENNEDY, C. J. Alteration of immune function endpoints and differential expression of estrogen receptor isoforms in leukocytes from 17 β -estradiol exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 180, p. 24-32, 2013.

SHIBATTA O. A.; ORSI M. L.; BENNEMANN S. T.; SILVA-SOUZA A. T. **Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi**. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (eds) A bacia do rio Tibagi. Londrina, pp 399–419, 2002.

SILVA, R. R. P. D.; PIRES JUNIOR, O. R.; GRISOLIA, C. K. Toxicity and genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) induced by microcystins from a bloom of *Microcystis* spp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 750-755, 2010.

SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W. A., MARTINS, M. L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystomac fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquatic Research** v. 43, p. 908–916, 2012.

SINDAN. Compêndio de Produtos Veterinários, 2018. Disponível em: www.cpvsv.com.br/cpvsv/

SINGH, S. K.; TIWARI, V. K.; CHADHA, N. K.; MUNILKUMAR, S.; PRAKASH, C.; PAWAR, N. A. Effect of dietary synbiotic supplementation on growth, immune and physiological status of *Labeo rohita* juveniles exposed to low pH stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 91, p. 358-368, 2019.

SOOD, S.; NERURKAR, V. Fatal necrotizing soft tissue infection by *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 4, DD06-DD07, 2014.

SOTO, E.; FERNANDEZ, D.; HAWKE, J. P. ATTENUATION of the fish pathogen *Francisella* sp. By mutation of the iglC* gene. **Journal of Aquatic Animal Health**, 21(3), 140-149. 2009.

SUHET, M. I.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; AMARAL, L.A. Atividade hemolítica e resistência a antimicrobianos por espécies de *Aeromonas* isoladas de criação intensiva de Tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). **Ars Vet**, 27(1), 36-44. 2011.

- STOSKOPF, M. K. **Bacterial diseases of goldfish, koi, and carp.** In: Stoskopf, M.K. (ed.) *Fish Medicine*, W.B. Saunders Company: Philadelphia, 1993.
- STRATEV, D.; ODEYEMI, O. A. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. **Journal of infection and public health**, v. 9, n. 5, p. 535-544, 2016.
- SUSSEL, F.R.; VIEGAS, E.M.M.; EVANGELISTA, M.M.; GONÇALVES, G.S.; SALLES, F.A.; GONÇALVES, L.U. Replacement of animal protein with vegetable protein in the diets of *Astyanax altiparanae*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 36, n. 4, p. 343-348, 2014.
- TAVARES, G. C.; QUEIROZ, G. A.; ASSIS, G. B. N.; LEIBOWITZ, M. P.; TEIXEIRA, J. P.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Disease outbreaks in farmed Amazon catfish (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma corruscans*) caused by *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae*, and *S. dysgalactiae*. **Aquaculture**, v. 495, p. 384-392, 2018.
- TOGUYENI, A.; FAUCONNEAU, B.; BOUJARD, T.; FOSTIER, A.; KUHN, E. R.; MOL, K. A.; BAROILLER, J. F. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. **Physiology & Behavior**, v. 62, n. 2, 273-279, 1997.
- THOMAS, J.; MADAN, N.; NAMBI, K. S. N.; MAJEED, S. A.; BASHA, A. N.; HAMEED, A. S. Studies on ulcerative disease caused by *Aeromonas caviae*-like bacterium in Indian catfish, *Clarias batrachus* (Linn). **Aquaculture**, 376, 146-150. 2013.
- TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology** v. 35, p. 1366–1375, 2011.

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, n. 10, p. 1174-1179, 1974.

TSAI, M. S.; KUO, C. Y.; WANG, M. C.; WU, H. C.; CHIEN, C. C.; LIU, J. W. Clinical features and risk factors for mortality in *Aeromonas* bacteremic adults with hematologic malignancies. **Journal of microbiology, immunology, and infection**, v. 39, n. 2, p. 150-154, 2006.

VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., & PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018. doi: 10.1111/raq.12164.

VENTURA, M. T.; GRIZZLE, J. M. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, v. 11, n. 5, p. 397-407, 1988.

VINH, D. C.; EMBIL, J. M. Severe skin and soft tissue infections and associated critical illness. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, n. 5, p. 415-421, 2007.

VOLKOFF, H.; LONDON, S. Nutrition and reproduction in fish. **Encyclopedia of Reproduction**, p. 743-748, 2018.

WILKIE, M.P. LAURENT, P. CHEVALIER, C. WOOD, C.M. THE dynamic role of the fish gill in extremely alkaline environments. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B, (4): 665-673. 1996.

WOOD, C. M. Toxic response of the gill. In: SCHLENK, D.; BENSON, W. H. (Org.). Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. London: Taylor and Francis, 2001, 1-89. 2001.

WOOLEY, R. E.; RITCHIE, B. W.; BURNLEY, V. V. In vitro effect of a buffered chelating agent and neomycin or oxytetracycline on bacteria associated with diseases of fish. **Diseases of aquatic organisms**, v. 59, n. 3, p. 263-267. 2004.

YAMBOT, A. V. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from *Oreochromis niloticus* during fish disease outbreaks in the Philippines. **Asian fisheries science**, 10, 347-354.1998.

YÁÑEZ, M. A.; CATALÁN, V.; APRÁIZ, D.; FIGUERAS, M. J.; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology** v. 53, p. 875–883, 2003.

YARDIMCI, B.; AYDIN, Y. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 58, n. 1, p. 47-54. 2011.

YOSHIMIZU, M.; KASAI, H.; AOKI, T.; OTOTAKE, M.; SAKAI, M.; JUNG, T.-S.; HIKIMA, J.; OKAMOTO, N.; SAKAMOTO, T.; OZAKI, A.; YAZAWA, R. Fish Diseases- Prevention and treatment of diseases caused by fish pathogens. [s.l.] Eolss Publishers / UNESCO, 2016.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os fatores de manejo reprodutivo e de despesca que influenciam no curso da infecção com *Aeromonas hydrophila* em *Astyanax altiparanae* pelo método de banhos de imersão.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do manejo com diferentes materiais de redes de despesca em *Astyanax altiparanae* infectados com *A. hydrophila*.
- Determinar se o protocolo de reversão sexual com suplementação de estradiol na alimentação inicial de *Astyanax altiparanae* modifica a susceptibilidade da espécie à infecção por *A. hydrophila*.
- Avaliar a susceptibilidade de *Astyanax altiparanae* à infecção experimental por *A. hydrophila* sob diferentes temperaturas e pH da água.

5. CAPÍTULO 1

Influencia do tipo de rede de captura e o sexo na infecção experimental por banhos de imersão com *Aeromonas hydrophila* em *Astyanax altiparanae*

Neste experimento, testou-se a influência do tipo de material da rede de captura utilizada no manejo de machos e fêmeas de lambaris do rabo amarelo, no curso da infecção com *A. hydrophila*.

5.1 INTRODUÇÃO

Os peixes de criação são constantemente expostos aos vários procedimentos de manejo, como redes, retenção, transporte, exposição ao ar e confinamento que podem comprometer a homeostase dos peixes (DROR et al., 2006). O manejo com rede induz uma resposta acentuada ao estresse (BRIJS et al., 2019) e pode resultar em diferentes graus de lesões na pele dos peixes, aumentando o risco de infecções fúngicas e bacterianas secundárias (CONTE, 2004; COLOTELO & COOKE, 2011).

A malha da rede usada na pesca e na aquicultura pode variar de acordo com o material, embora os tipos mais comuns sejam nylon, polipropileno, polietileno e borracha (LIZÉE et al., 2018). O tipo de material de malha influencia a magnitude dos ferimentos com a rede. O nylon provou induzir danos na pele de peixes, após sujeição maiores em comparação com a rede têxtil macia (GALLARDO et al., 2010), borracha ou polipropileno (BARTHEL et al., 2003; LIZÉE et al., 2018). No entanto, a maioria dos estudos sobre o material da rede está relacionada a pescarias com tempos de compensação longos, enquanto há poucas informações sobre a aquicultura e seus procedimentos mais curtos.

Os danos na pele induzidos pelo manejo com rede, costumam ser visíveis e portanto facilmente identificados, no entanto, a pele do peixe pode ficar com úlceras sem exibir sinais óbvios de dano (COLOTELO & COOKE, 2011). A fluoresceína, um corante vital amarelo não tóxico relativo, pode penetrar no epitélio danificado sem se ligar aos tecidos intactos (BARTLETT et al., 1996). Esse corante foi usado para detectar danos na pele de peixes antes que seja visível a olho nu para salmonídeos e outras espécies de criação com lesões cirúrgicas na pele (NOGA & UDOMKUSONSRI, 2002), espécies de peixes esportivos de água doce com lesões por rede (COLOTELO & COOKE, 2011) e para pacu infectados experimentalmente com *A. hydrophila* (MARCUSO et al., 2014).

Astyanax sp é um gênero da família Characidae amplamente distribuído na região neotropical desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (FROESE & PAULY, 2013). As espécies mais desenvolvidas para a aquicultura são o rabo amarelo *Astyanax altiparanae*, também conhecido por seu nome comum lambari (GARUTTI & BRISTKI, 2000). Apesar de seu pequeno tamanho, o cultivo de rabo amarelo é promissor para a aquicultura brasileira devido ao seu uso como lanche gourmet ou como isca viva para a pesca esportiva (VALLADÃO et al., 2018).

Durante o cultivo de *A. altiparanae*, as fêmeas tendem a crescer mais do que os machos, o que torna a produção monosssexual viável, embora ainda não seja aplicada comercialmente (VALLADÃO et al., 2018). Antes que o uso em larga escala do cultivo monossexo seja estabelecido, é importante determinar que características indesejáveis não estejam sendo incluídas no peixe monossexo (PETERSON & DAVIS, 2012). Diferenças na resposta imune e

consequente suscetibilidade a doenças entre machos e fêmeas no lambari são desconhecidas, entretanto o sexo é um importante fator que influencia o sistema imunológico dos peixes (MAGNADOTTIR, 2010).

Descrições científicas de patógenos bacterianos no cultivo do lambari são escassas, porém relatos de piscicultores e diagnósticos laboratoriais permitiram caracterizar que os problemas mais comuns na lambaricultura estão associados a doenças bacterianas indutoras de septicemia hemorrágica (VALLADÃO et al., 2018). A infecção por *A. hydrophila* leva à septicemia hemorrágica e provou ser virulenta para *Astyanax bimaculatus*, uma espécie intimamente relacionada (JATOBÁ et al., 2017). A infecção por esse patógeno em teleósteos tropicais relacionados é caracterizada pela presença de lesões de pele, hemorragias, úlceras e distensão abdominal (OLIVEIRA et al., 2011; MARINHO-NETO et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito de uma prática comum da aquicultura como a despesca com rede, com três tipos diferentes de malha de rede, sobre o curso de uma infecção experimental com *A. hydrophila* em lambari de rabo amarelo fêmeas e machos, *A. altiparanae*, simulando uma rota de infecção natural (desafio de imersão).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Peixes e condições experimentais

Foram utilizados 256 juvenis de lambari do rabo amarelo, *Astyanax altiparanae*, provenientes do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), e transportados para as instalações do Centro de Pesquisas em Parasitologia e Patologia (CPPAR), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV),

Unesp-Jaboticabal. Os lambaris foram aclimatados por duas semanas prévias ao início do experimento. Os peixes foram mantidos em aquários de vidro (100 L) com água proveniente de poço artesiano, aeração contínua, filtro mecânico e termostato. A sexagem foi realizada com base nas características na ponta da nadadeira anal, a qual apresenta espículas nos machos facilmente sentido pelo tato (VALLADÃO et al., 2018). A qualidade da água foi avaliada semanalmente por meio de sondas multiparâmetros e permaneceu dentro da faixa para esta espécie (RODRIGUES, 2013) (oxigênio dissolvido = 5,6 mg L⁻¹, temperatura = 25,6°C, pH = 7,6 e condutividade elétrica = 117,9 µS cm⁻¹). Os peixes receberam ração comercial duas vezes ao dia *ad libitum* (Nutripiscis, 2-3 mm, 45% de proteína bruta). O protocolo ético para este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista (CEUA-UNESP) sob protocolo número 014773/19 de acordo com as diretrizes de cuidado e uso de animais de laboratório das leis brasileiras.

5.2.2 Delineamento experimental

Animais da mesma idade (fêmeas 4,8 ± 2,02g, 5,85 ± 1,12cm e machos 4,2 ± 1,04g, 5,50 ± 0,43cm) foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos experimentais, considerando o sexo (fêmeas e machos), infecção por *A. hydrophila* (infectados ou não) e quatro tipos de material de rede de captura: (T1♀ -T1 ♂ rede de nylon), (T2♀ -T2 ♂ rede de polipropileno), (T3♀ -T3 ♂ rede de polietileno), (T4♀ -T4 ♂ grupo controle sem uso de rede), em duplicata (Fig. 1).

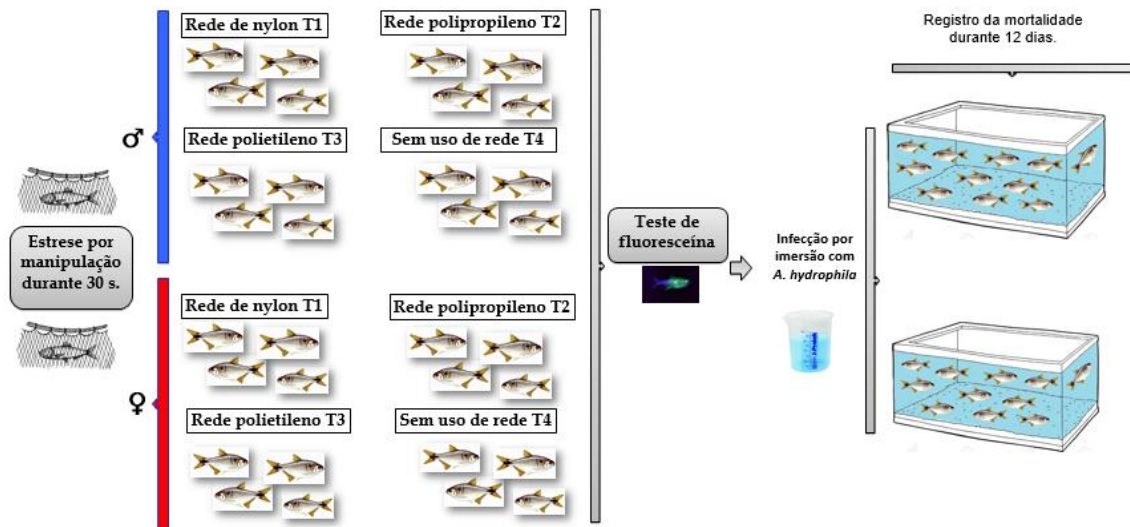


Figura 1. Desenho experimental do experimento.

Antes da infecção experimental, os peixes foram submetidos ao estresse por captura com os três tipos de materiais de rede: micro-malha de nylon sem nós; polipropileno sem nós; polietileno sem nós (Fig. 2), sendo mantidos apertados na rede acima da superfície da água e balançados de um extremo ao outro por 30 segundos (BARTHEL et al., 2003). Os peixes manipulados sem rede (grupo controle) foram manejados individualmente substituindo o uso das redes por sacos plástico com água.

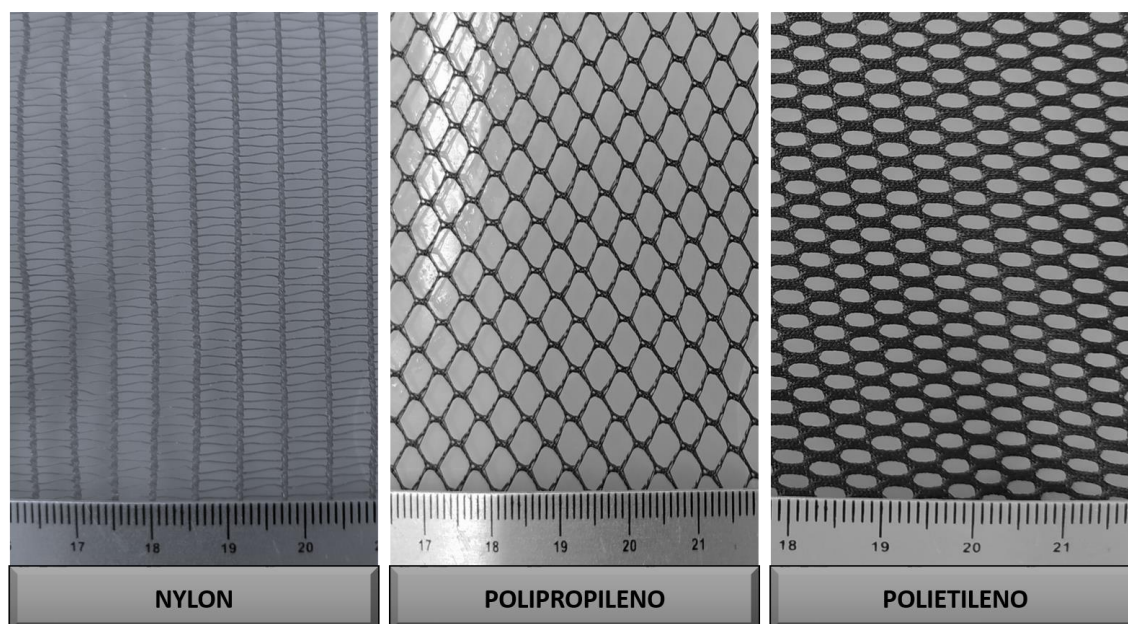


Figura 2. Imagens dos três tipos de materiais de rede de captura utilizadas no experimento: rede de nylon, rede de polipropileno, rede de polietileno.

Posteriormente, cinco peixes por grupo foram anestesiados em solução de benzocaína (100 mg L^{-1}) (E1501, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) previamente dissolvida em álcool puro (GIMBO et al., 2008) e submetidos ao teste da fluoresceína, com a finalidade de avaliar a integridade da pele e observar presença de lesões cutâneas induzidas pela rede de captura. Após o teste, os peixes foram infectados com solução diluída de *A. hydrophila* seguindo um método de imersão descrito por Rodríguez et al., 2008 para paulistinhas, *Danio rerio*. Finalmente, os peixes retornaram aos aquários e a mortalidade foi registrada durante 12 dias. Os animais foram avaliados diariamente para verificação de alterações comportamentais e anatomopatológicas, assim como da mortalidade pós-infecção.

5.2.3 Bactéria e preparação do inóculo bacteriano

Uma cepa patogênica de *Aeromonas hydrophila* (09AH1) isolada naturalmente de um surto de doença em tilápias do Nilo (YUNIS-AGUINAGA et al., 2016) foi utilizada nas infecções experimentais. A cepa foi caracterizada

geneticamente, para o qual uma 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 RNA 16S do gene ribossômico foi realizada de acordo com Sarkar et al. (2012) utilizando os primers direto (AACCTGGTTCCGCTCAAGCCGTTG) e primer reverso (TTGCCTCGCCTCGGCCAGCAGCT). As sequências foram analisadas pelo algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e confirmadas por sequenciamento, obtendo-se uma similaridade de 98% com a cepa CP007518.2 (número de acesso).

As bactérias foram mantidas congeladas a -80°C em caldo de tripticaseína de soja (TSB, Kasvi, São José do Pinhais, Brasil) suplementado com glicerol a 15% (v / v). Para a reativação da cepa esta foi cultivada em agar tripticaseína de soja (TSA, Kasvi) e incubada a 28°C por 24h. A cepa foi reativada *in vivo* por meio da inoculação intracelomática em lambaris e posterior reisolamento (três passagens). As suspensões bacterianas foram preparadas transferindo uma única colônia de *A. hydrophila* para tubos Falcon com 50mL de TSB e reincubadas a 28°C em um agitador bacteriológico (New Brunswick Scientific, New Jersey, EUA). Vinte e quatro horas após a incubação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas (Sorvall Legend Mach 1.6R, Alemanha) a 10.000 g / 10 min / 4°C, duas vezes. A massa bacteriana foi ressuspensa em tampão fosfato salino (PBS). A concentração bacteriana foi estimada por espectrofotometria e confirmada pela determinação de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de diluições seriadas da cultura original (1,400 densidade óptica DO_{600 nm}- 1.23 x 10⁹).

5.2.4 Infecção experimental

Os peixes de cada aquário foram transferidos para béqueres de vidro de 2L contendo 1L de água livre de cloro com 45mL de solução de *A. hydrophila* suspensa em PBS estéril e mantidos submersos por 2h, com aeração constante. A seguir, os peixes retornaram aos aquários. Nos grupos não infectados, as bactérias foram substituídas por 45mL de PBS estéril. Amostras de brânquias, rim cranial, fígado e pele de peixes moribundos foram cultivadas em placas de TSA e incubadas por 24h a 28°C, em condições de aerofilia para corroborar a causa da morte. Amostras aleatórias das colônias bacterianas foram confirmadas como *A. hydrophila* por meio de análises bioquímicas e moleculares (SARKAR et al., 2012).

5.2.5 Teste de fluoresceína

Os peixes foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína 100mg L⁻¹ foram colocados em solução aquosa com 0,10 mg/mL de fluoresceína sódica (Ophthalmos, São Paulo, Brasil) por 15 min. Posteriormente, os peixes foram colocados em água limpa por 2 min. Finalmente, foram transferidos para sala escura iluminada com luz negra e fotografados em ambos dos lados contra um fundo preto para a detecção e caracterização das lesões induzidas pelo manejo brusco com a rede. O procedimento seguiu o protocolo utilizado anteriormente (MARCUSO et al., 2014).

5.2.6 Sobrevivência acumulada

A porcentagem de mortalidade acumulada de cada grupo foi avaliada por 12 dias considerando a fórmula: $[(n^{\circ} \text{ mortes} / n^{\circ} \text{ total de animais}) * 100]$. Os peixes que sobreviveram e peixes moribundos com sinais clínicos irreversíveis

foram submetidos a eutanásia por meio de overdose em solução alcoólica de benzocaína (Sigma-Aldrich).

5.2.7 Análise histopatológica

Fragmentos de brânquias, rim cranial, baço, pele e fígado foram coletados de animais sobreviventes à infecção e fixados em formalina tamponada a 10% por 24h, após esse período, as amostras foram preservadas em álcool a 70% até seu processamento. As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina. Assim, o material foi desidratado numa série de álcoois, clarificado em xilol, incluído em parafina e cortado com micrótomo semiautomático em lâminas de 5µm de espessura. As lâminas foram coradas mediante a técnica de hematoxilina-eosina (H&E). As técnicas foram executadas seguindo as diretrizes descritas pelos Bancroft & Gambe (2002). Todas as amostras foram examinadas sob microscópio de luz (Olympus BX 51, Olympus Corporation, Tóquio, Japão) e as imagens foram fotografadas usando câmera digital (Olympus DP72, Olympus).

5.2.8 Análise estatística

Os dados de mortalidade das repetições foram plotados como um único grupo. As diferenças na sobrevivência foram avaliadas pelo método de Kaplan e Meier e o teste de Log-rank (MantelCox). As variáveis foram consideradas significativamente diferentes quando $P < 0,05$, com um nível de significância de 95%. Na análise estatística utilizou-se o software estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

5.3 RESULTADOS

Houve crescimento bacteriano em todos os tecidos de peixes moribundos avaliados: brânquias, fígado, rins e pele; independentemente do

sexo dos animais e do grupo experimental, a partir das 24h pós infecção. As colônias bacterianas isoladas apresentaram características compatíveis com a espécie, redondas com cor creme e halo transparente, com 2-4mm de diâmetro. Bacilos Gram-negativos, catalase e oxidase positivos e com identificação compatível com *Aeromonas hydrophila* pelo kit Bactray. A confirmação por PCR resultou em 99% de similaridade com esta espécie.



Figura 3. Lesões cutâneas em lambaris manejados com distintos tipos de material de rede e infectados com *A. hydrophila* pelo método de banho de imersão. A. Pele e escamas intatas (animal não infectado) B. Perda de escama e erosão da pele (peixe manejado com rede de polipropileno e infectado, seta branca). C. Erosão e equimose na nadadeira caudal (seta branca). Úlcera hemorrágica (seta preta) (manejado com rede de nylon e infectado). D. Úlcera (seta preta) (peixe manejado com rede de polipropileno e infectado). Barra 1 cm.

Diferentes graus de lesões cutâneas incluindo perda de escamas, erosões e equimose foram evidenciadas em animais com morte recente (Fig. 3). Na histopatologia dos animais sobreviventes observaram-se úlceras e hemorragia na pele; nas brânquias, os animais apresentaram congestão, hemorragia e perda de lamelas secundárias; no fígado, observou-se congestão, hemorragia e degeneração hidrópica (Fig. 4). Em outros órgãos, como baço e rim, não foram evidenciados maiores alterações histopatológicas.

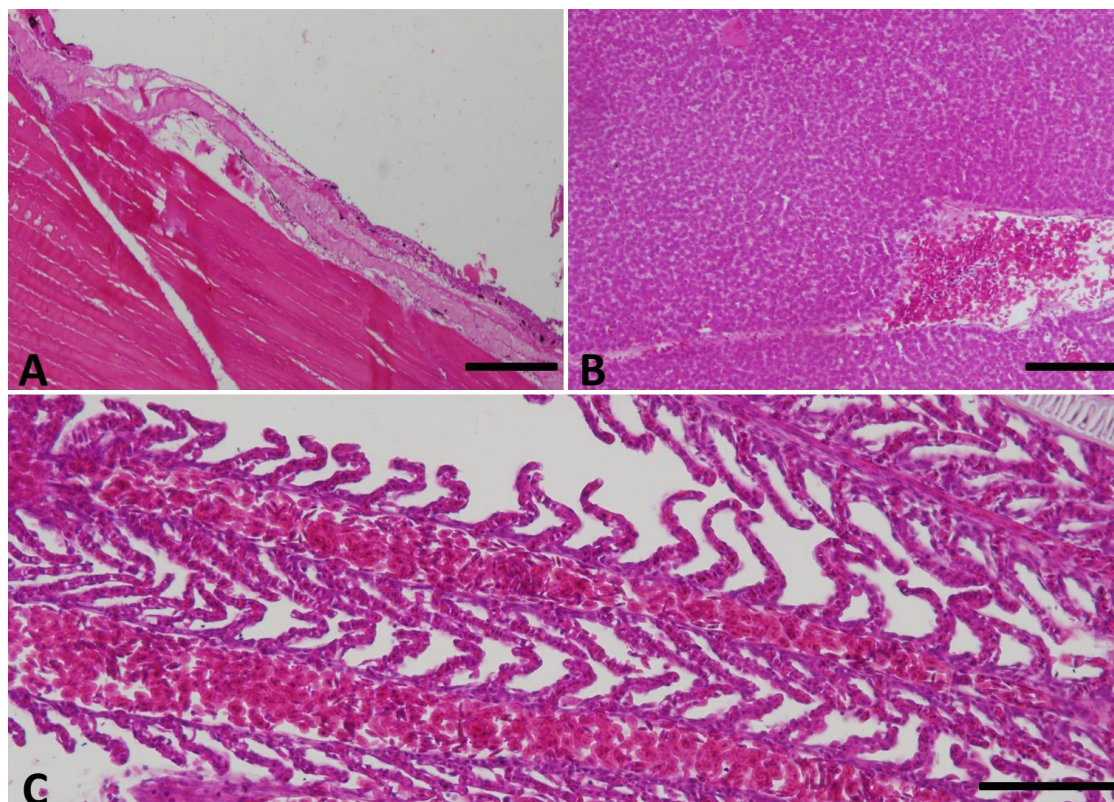


Figura 4. Alterações histopatológicas em *A. altiparanae* sobreviventes a infecção experimental via banho com *A. hydrophila*. (A) Pele. Solução de continuidade do epitélio e hemorragia. Barra 200 μ m. (B) Fígado. Leve congestão da veia central e leve degeneração hidrópica. Barra 100 μ m (C). Brânquias. Moderada a severa congestão. Barra 20 μ m. Coloração H&E.

Peixes manipulados com a rede de nylon, tanto fêmeas quanto machos, apresentaram lesões na maior parte da superfície do corpo. No caso dos animais manejados com redes de polipropileno e polietileno, os danos à pele foram restritos apenas a algumas áreas do corpo (fêmeas e machos). Finalmente, o grupo controle, manipulado sem rede, não apresentou sinal de perda da integridade da pele durante o teste da fluoresceína (Fig. 5).

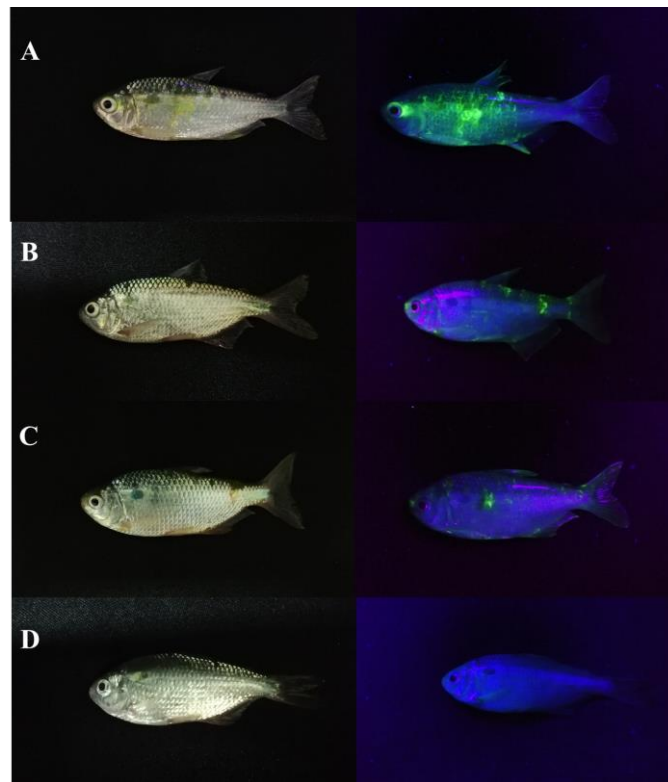


Figura 5. Padrões de integridade cutânea detectada pelo teste de fluoresceína em *A. altiparanae* imediatamente após o manuseio com diferentes tipos de materiais de rede de captura (A) Nylon. (B) Polipropileno. (C) Polietileno. (D) Grupo manejado sem rede. À esquerda, peixe sob luz regular, à direita, peixe sob luz preta.

Nenhum dos grupos não infectados (injetados com PBS) apresentou mortalidade ou sinais clínicos e foram excluídos da tabela de sobrevivência (dados não mostrados). Para os resultados, os grupos experimentais apresentam-se da seguinte forma: T1♀-T1 ♂ rede de nylon; rede de polipropileno T2♀-T2♂; rede de polietileno T3♀-T3♂; e T4♀-T4 ♂ manipulado à mão sem uma rede.

A porcentagem de sobrevivência foi calculada, baseado na mortalidade acumulada até o dia 12 após desafio, alcançando 50% no grupo T1♀-T1 ♂, 87,5 nos grupos T2♀-T2♂, 93,75 no grupo T3♂ e 100% nos grupos T3♀, T4♀, T4 ♂. Os animais manipulados com rede de nylon e infectados apresentaram maior mortalidade e sobrevivência significativamente menor em relação aos grupos restantes ($p < 0,05$). A sobrevivência nos grupos manipulados com as

redes de polipropileno e polietileno foram semelhantes ao grupo controle manuseado sem rede. Em nenhum dos casos, foram observadas diferenças estatísticas na sobrevivência associadas ao sexo ($p > 0,05$) (Fig. 6).

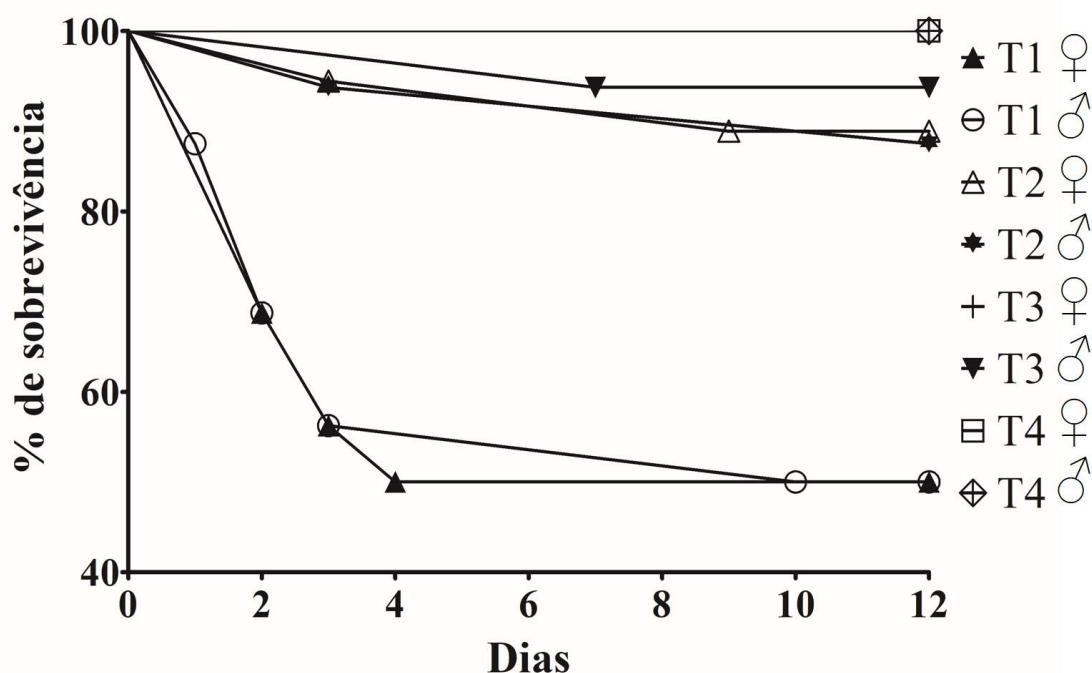


Figura 6. Sobrevivência de *A. altiparanae* manipulados com diferentes tipos de rede e após desafio por imersão com *A. hydrophila* por 12 dias. T1♀-T1 ♂ (rede de nylon), T2♀-T2 ♂ (rede de polipropileno), T3♀-T3 (rede de polietileno), T4♀-T4 ♂ (manuseado sem rede).

5.4 DISCUSSÃO

O manuseio dos peixes com rede durante a despesca pode resultar em danos à pele, perda de muco e escamas, atraso no crescimento, infecção e morte em várias espécies. As lesões nos peixes podem ser causadas por interações com a estrutura da rede, outros peixes na rede e por esmagamento com a biomassa ou detritos na rede (DAVIS & OTTMAN, 2006).

No presente estudo, o lambari do rabo amarelo mostrou sensibilidade cutânea ao tipo de rede, já que peixes expostos a qualquer dos tratamentos com rede exibiram algum grau de lesão na pele. Estudos na pesca esportiva,

do tipo pesque e solta, com percas-sol de guelras azuis, *Lepomis macrochirus*, mostraram que peixes enganchados no anzol e manuseado na mão, apresentaram menor dano à pele e mortalidade do que aqueles enganchados e manipulados por diferentes tipos de rede durante 30 segundos (BARTHEL et al., 2003). Entretanto, nem todas as espécies de peixes apresentam o mesmo grau de sensibilidade ao manejo com rede. Colotelo & Cooke (2011) relataram que nem a malha de nylon com presença de nós, nem a malha de borracha induziram danos significativos no achigã, *Micropterus salmoides*, mantidos em redes de captura por 30s. Enquanto que, danos epiteliais extensos foram observados no lúcio, *Esox lucius* mantidos nas mesmas condições (COLOTELO & COOKE, 2011).

Diferenças na perda de escamas, perda de muco e integridade da pele induzidas pelas redes em diferentes espécies provavelmente podem ser explicados pelas diferenças no comportamento de cada espécie, sendo maior em espécies mais musculares ou selvagens, com reações exageradas de fuga (LIZÉE et al., 2017). Outro fator que poderia explicar a sensibilidade de *A. altiparanae* aos procedimentos de compensação é o tamanho pequeno e o fácil desprendimento das escamas desta espécie.

Os danos corporais causados pela fricção contra a tela de nylon e o fato de o nylon ser material mais abrasivo que o polipropileno e o polietileno explicam a maior extensão de lesões observadas neste grupo. Cooke & Hogle (2000) descreveram lesões e mortalidade a curto prazo no robalo (*Micropterus dolomieu*) após mantê-los em redes de nylon. Um estudo descritivo sobre lesões detectadas pelo teste de fluoresceína na pele de *Lepomis macrochirus* submetidos a manejo com rede por 30 segundos, verificaram que o nylon sem

nós era mais prejudicial que a borracha ou a malha de polipropileno com nós finos (BARTHEL et al., 2003). Porém, as conclusões deste trabalho não foram claras, pois as diferenças podem estar relacionadas tanto à presença de nós na rede quanto ao tipo de material da malha, razão pela qual para este tipo de experimentos recomenda-se trabalhar com malhas de formato semelhante, mudando apenas o material da mesma. Pesquisas recentes relataram que em trutas de salgueiro, *Salvelinus fontinalis*, submetidas a pesca recreativa de captura e liberação, a retenção durante 1h em redes de malha de nylon induziu perda de escamas e de muco mais intensas que as redes de borracha ou polipropileno (LIZÉE et al., 2017).

A camada epitelial fornece proteção física e secreta muco, ativando fatores imunes como lisozima, imunoglobulinas e proteínas do complemento em resposta a uma lesão na pele ou infecção por patógenos (SHEPHARD, 1994). A importância de um tegumento íntegro foi apreciável nos lambaris não manipulados com rede e infectados, que apesar de estar submetidos a doses altas de bactéria não apresentaram mortalidade alguma, sugerindo papel primordial da integridade epitelial na infecção por *A. hydrophila* no lambari do rabo amarelo. Estudos análogos no salmão do Atlântico, *Salmo salar*, infectado com *A. salmonicida*, descreveram menor taxa de infecção em peixes com mucosa intacta, em comparação com animais com feridas cometidas artificialmente e peixes com muco da pele removido com toalha de papel (SVENDSEN et al., 1999). Assim mesmo, o manejo prévio com rede aumenta a suscetibilidade à infecção por *A. salmonicida* no kinguio, *Carassius auratus* (DROR et al., 2006). Da mesma forma, o dano à pele provou predispor à

infecção por *Flavobacterium columnare* durante o desafio por imersão no bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (BADER et al., 2006).

Durante o ciclo reprodutivo e a maturação sexual dos peixes ocorrem várias mudanças no sistema imunológico, que podem deixar aos animais com sistema imune débil e por tanto mais suscetível às doenças (BOWDEN et al., 2007; SIMKOVA et al., 2008). Baghizadeh & Khara, (2015) destacaram diferenças nos parâmetros hematológicos e imunológicos entre fêmeas e machos de carpa comum, *Cyprinus carpio*, sugerindo maior suscetibilidade às doenças. Porém, o presente estudo, difere destas afirmações uma vez que não houveram diferenças significativas na mortalidade entre machos e fêmeas, em concordância com outras pesquisas como registrado no peixe-gato do canal infectado experimentalmente com *Edwardsiella ictaluri* (PETERSON & DAVIS, 2012) e no medaka *Oryzias javanicus* infectados experimentalmente com *Streptococcus agalactiae* (AMAL et al., 2018). A ausência de diferenças na mortalidade após infecção é sugestiva de ausência de diferenças nos parâmetros imunológicos entre fêmeas e machos de lambari, porém maiores pesquisas neste tópico devem ser realizadas.

5.5 CONCLUSÕES

Estudos relacionados ao uso adequado de redes de captura permitem garantir o bem-estar dos peixes. Os dados sugerem que o polipropileno e o polietileno, ao invés da rede de nylon, são os melhores tipos de rede para o manejo de *A. altiparanae*, com reduzido impacto na integridade do epitélio cutâneo e na susceptibilidade a *A. hydrophila*. Recomenda-se aprofundar nas pesquisas sobre redes de polipropileno e polietileno de várias subtipos (tipo de nós, diâmetros dos nós) a fim de estabelecer o tipo de rede mais adequada para o manejo de lambari.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAL, M. N. A.; ZARIF, S. T.; SUHAIBA, M. S.; AIDIL, M. R. M.; SHAQINAH, N. N.; ZAMRI-SAAD, M.; ISMAIL, A. The effects of fish gender on susceptibility to acute *Streptococcus agalactiae* infection in Javanese medaka *Oryzias javanicus*. **Microbial pathogenesis**, 114, 251-254. 2018.
- BADER, J. A.; MOORE, S. A.; NUSBAUM, K. E. The effect of cutaneous injury on a reproducible immersion challenge model for *Flavobacterium columnare* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 253, n. 1-4, p. 1-9, 2006. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.04.059
- BAGHIZADEH, E.; KHARA, H. Variability in hematology and plasma indices of common carp *Cyprinus carpio*, associated with age, sex and hormonal treatment. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 14, n. 1, p. 99-111, 2015.
- BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques** (5th ed.). Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, 2002.
- BARTHEL, B. L.; COOKE, S. J.; SUSKI, C. D.; PHILIPP, D. P. Effects of landing net mesh type on injury and mortality in a freshwater recreational fishery. **Fisheries Research**, v. 63, n. 2, p. 275–282, 2003. doi: 10.1016/S0165-7836(03)00059-6.
- BARTLETT, J. D.; GHORMLEY, N. R.; JAANUS, S. D.; ROWSEY, J. J.; ZIMMERMAN, T. J. Ophthalmic dyes. Ophthalmic drug facts. Facts and comparisons Wolters Kluwer Co., St. Louis, MO, 1996.
- BOWDEN, T. J.; THOMPSON, K. D.; MORGAN, A. L.; GRATACAP, R. M. L.; NIKOSKELAINEN, S. Seasonal variation and the immune response: a fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 695–706, 2007.
- BRIJS, J.; SANDBLOM, E.; ROSENGREN, M.; SUNDELL, K.; BERG, C.; AXELSSON, M.; GRÄNS, A. Prospects and pitfalls of using heart rate bio-

loggers to assess the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in aquaculture. *Aquaculture*, 509, 188-197. 2019.

COLOTELO, A. H.; COOKE, S. J. Evaluation of common angling-induced sources of epithelial damage for popular freshwater sport fish using fluorescein. **Fisheries Research**, v. 109, n. 2-3, p. 217-224, 2011. doi: 10.1016/j.fishres.2010.12.005

CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3-4, p. 205-223, 2004. doi: 10.1016/j.applanim.2004.02.003

COOKE, S. J.; HOGLE, W. J. Effects of retention gear on the injury and short-term mortality of adult smallmouth bass. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 20, n. 4, p. 1033-1039, 2000. doi: 10.1577/1548-8675(2000)020<1033:EORGOT>2.0.CO;2.

DAVIS, M. W.; OTTMAR, M. L. Wounding and reflex impairment may be predictors for mortality in discarded or escaped fish. **Fisheries Research**, v. 82, n. 1-3, p. 1-6, 2006. doi:10.1016/j.fishres.2006.09.004.

DROR, M.; SINYAKOV, M. S.; OKUN, E.; DYM, M.; SREDNI, B.; AVTALION, R. R. Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 3-4, p. 279-287, 2006. doi:10.1016/j.vetimm.2005.08.022.

FROESE, R.; PAULY D. FishBase [Word Wide Web Electronic Publication]. www.fishbase.org. 2013.

GALLARDO, J. M.; ALAVI, S. M. H.; ADÁMEK, Z.; DROZD, B. External damage and changes in blood parameters in female tench, *Tinca tinca* (L.) retained in

anglers' keepnets. **Reviews in fish Biology and Fisheries**, v. 20, n. 3, p. 403-408, 2010. doi: 10.1007/s11160-009-9149-7

GARUTTI, V.; BRISTKI, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS Série Zoologia**, v. 13, p. 65-88, 2000.

GIMBO, R.Y.; SAITA, M.V.; GONÇALVES, A.F.N.; TAKAHASHI, L.S. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-raboamarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 2, p. 350-357, 2008.

JATOBÁ, A.; MORAES, A. V.; STECKERT, L. D.; JESUS, G. F. A. Selection of autochtone probiotic for *Astyanax bimaculatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1645-1652, 2017. doi: 10.1590/1678-4162-9158

LIZÉE, T. W.; LENNOX, R. J.; WARD, T. D.; BROWNSCOMBE, J. W.; CHAPMAN, J. M.; DANYLCHUK, A. J.; NOWELL, L. B.; COOKE, S. J. Influence of Landing Net Mesh Type on Handling Time and Tissue Damage of Angled Brook Trout. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 38, n. 1, p. 76-83, 2018. doi: 10.1002/nafm.10033.

MAGNADOTTIR, B. Immunological control of fish diseases. **Marine biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 361-379, 2010.

MARCUSSO, P.F.; YUNIS, J.; CLAUDIANO, G.S.; MANRIQUE, W.G.; SALVADOR, R.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Sodium fluorescein for early detection of skin ulcers in *Aeromonas hydrophila* infected *Piaractus*

mesopotamicus. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 34, n. 3, p. 102-106, 2014.

MARINHO-NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVA-QUIROZ, V. A.; KOBASHIGAWA, K. K.; CRUZ, N. R.; MORAES, R. F.; MORAES, J. R. Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. **PloS one**, v. 14, n. 9, e0222626, 2019.

NOGA, E. J.; UDOMKUSONSRI, P. Fluorescein: a rapid, sensitive, nonlethal method for detecting skin ulceration in fish. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p. 726-731, 2002. doi: 10.1354/vp.39-6-726

OLIVEIRA, S. R.; SOUZA, R. T. Y. B.; BRASIL, E. M.; ANDRADE, J. I. A.; NUNES, É. S. S.; ONO, E. A.; AFFONSO, E. G. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 321-326, 2011.

PETERSON, B. C.; DAVIS, K. B. Effects of gender and sex hormones on disease susceptibility of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, n. 5, p. 733-738, 2012. doi: 10.1111/j.1749-7345.2012.00588.x

RODRIGUES, A. P. O., LIMA, A. E., ALVES, A. L., ROSA, D. K., TORATI, L. S. & SANTOS, V. R. V. Piscicultura de água doce: Multiplicando conhecimentos. EMBRAPA. Brasil, 2013.

RODRÍGUEZ, I.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, 25(3), 239-249. 2008.

SARKAR, A.; SAHA, M.; ROY, P. Identification and Typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR Fingerprinting. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 3, p. 142, 2012.

SHEPHARD, K. L. Functions for fish mucus. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, n. 4, p. 401–429, 1994.

SIMKOVA, A., LAFOND, T., ONDRACKOVA, M., JURAJDA, P., OTTOVA, E., & MORAND, S. Parasitism, life history traits and immune defence in cyprinid fish from Central Europe. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 29, 2008. doi: 10.1186/1471-2148-8-29

SVENDSEN, Y. S.; DALMO, R. A.; BØGWALD, J. Tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following experimental challenge. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 2, p. 125-131, 1999. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00153.x

VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., & PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018. doi: 10.1111/raq.12164.

YUNIS-AGUINAGA, J., FERNANDES, D. C., ETO, S. F., CLAUDIANO, G. S., MARCUSO, P. F., MARINHO-NETO, F. A. & DE MORAES, J. R. E. Dietary camu camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p. 284-291, 2016.

6. CAPÍTULO 2

Influencia da suplementação com 17 β -estradiol na infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* em *Astyanax altiparanae* e avaliação da susceptibilidade de *Astyanax altiparanae* à infecção experimental por imersão com *Aeromonas hydrophila* sob diferentes condições de temperatura e pH da água.

O presente trabalho foi subdividido em dois experimentos, porém o material biológico, condições experimentais, bactéria utilizada e a preparação dos inóculos bacterianos foram análogas nos experimentos e descrevem-se por única vez.

6.1 INTRODUÇÃO

Lambaris é o nome utilizado para diferentes espécies do gênero *Astyanax*, amplamente distribuídas na região neotropical desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (FROESE & PAULY, 2013). Estes peixes são comumente utilizados como iscas vivas em pesque e pague por pescadores de espécies carnívoras (DA SILVA et al., 2011). O interesse pela criação comercial desta espécie, favoreceu o desenvolvimento de pesquisas para viabilizar e tecnificar sua produção, apesar deste interesse, são escassos os estudos referentes à sanidade na produção. Suspeita-se que uma das principais doenças que atinge a lambaricultura são as septicemias hemorrágicas associadas principalmente a *A. hydrophila*. Trata-se de um bastonete móvel com flagelos polares, não produz esporos, Gram negativa, não capsulada, aeróbia e anaeróbia facultativa (STOSKOPF, 1993). Possui ampla distribuição geográfica e induz septicemia, caracterizada pela presença de ulcerações cutâneas, hemorragias locais, particularmente nas brânquias e opérculos, e distensão abdominal. Internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, e lesões hemorrágicas no fígado e rins (GARCIA et al., 2009).

Diversos fatores predispõem os peixes ao estresse diminuindo a resposta imune e acrescentando a susceptibilidade a doenças. O estresse ambiental é um dos fatores que levam a surtos das doenças mais comuns na piscicultura (MARTINS et al., 2009). Esses surtos estão associados a mudanças rápidas na temperatura e pH da água, o que favorece a proliferação bacteriana (DAS et al., 2006; MARCOGLIESE, 2010).

Adicionalmente, a reversão sexual dos peixes, metodologia promissória no cultivo do lambari decorrente do crescimento mais acelerado das fêmeas poderia causar estresse nos animais. A reversão sexual utiliza como tratamento o estradiol, o qual é um estrógeno que atua na diferenciação sexual e mudanças de sexo, estimulando o desenvolvimento do tecido ovarino (NAKAMURA et al., 2003; PORTO-FORESTI et al., 2005; SATO et al., 2006). Entretanto, desconhece-se o efeito da suplementação com estradiol no sistema imune e susceptibilidade a doenças no lambari.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Experimento 1

Influência da suplementação com 17 β -estradiol e o sexo na infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* em *Astyanax altiparanae*.

O objetivo deste experimento foi avaliar se a suplementação de estradiol na alimentação inicial de larvas de *Astyanax altiparanae* modifica o curso da infecção por *A. hydrophila*.

6.2.2 Reprodução e obtenção das larvas

Os reprodutores de *A. altiparanae* foram mantidos em viveiros escavados de 200m³ no Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP). Durante a reprodução em janeiro de 2018, os lambaris aptos para a reprodução foram transferidos para o Laboratório de Reprodução de Peixes Nativos, distribuídos

em 3 caixas (10L), numa proporção de 1:2, sendo 4 fêmeas para 8 machos. O peso total dos reprodutores foi calculado e estabeleceram-se doses de 3-6 mg kg⁻¹ de extrato bruto de hipófise de carpa para fêmeas e machos, aplicadas em dose única. A temperatura da água após estimulação hormonal foi aferida de hora em hora e a unidade térmica acumulada foi determinada em 270 graus-horas. As larvas obtidas dessa reprodução induzida foram mantidas em incubadoras até o terceiro dia pós eclosão – dpe.

6.2.3 Peixes e condições experimentais

Larvas de *A. altiparanae* (4 dpe) foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos (quatro repetições) e alimentadas por 15 dias com náuplios de *Artemia* sp. suplementados com o hormônio 17β-estradiol, contendo os seguintes tratamentos: T1: 0 mg; T2: 2 mg; T3: 4 mgL⁻¹ de 17β-estradiol, quatro vezes ao dia até a saciedade aparente, os microcrustáceos foram mantidos em água salina. Após o período de 15 dias, os náuplios foram substituídos por ração comercial (Nutripiscis, 45% proteína bruta) suplementada com o hormônio, mantendo os mesmos tratamentos, os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia durante 40 dias, até a saciedade aparente. Depois deste período, os peixes foram mantidos em aquários de vidro nas mesmas condições descritas no capítulo I e receberam alimentação comercial sem adição de hormônio até o início do experimento (infecção experimental).

6.2.4 Delineamento experimental

Lambaris com peso médio 4,29 ± 1,81g, e comprimento médio 5,46 ± 0,61 cm, foram distribuídos em seis grupos, considerando o sexo (fêmeas e machos) e a suplementação com 17β-estradiol, a sexagem foi realizada com base nas características na ponta da nadadeira anal que apresenta aspecto

áspero facilmente sentido pelo tato nos machos (VALLADÃO et al., 2018). T1: machos sem suplementação hormonal, T2: fêmeas sem suplementação hormonal; T3: machos suplementados com 2 mg de 17β -estradiol T4: fêmeas suplementados oralmente com 2 mg de 17β -estradiol. T5: machos suplementados com 4 mg de 17β -estradiol T6: fêmeas suplementadas com 4 mg de 17β -estradiol. A infecção foi realizada por imersão em solução diluída de *A. hydrophila* em todos os grupos, os animais foram manejados com rede de nylon na superfície da água e agitados com movimentos por 30s. Grupos controle foram usados para todos os tratamentos, os quais receberam banho em solução de água livre de cloro não estéril misturada com 45mL de PBS estéril, porém não houve mortalidade ou sinais clínicos associados em nenhum deles (dados não apresentados). Os sinais clínicos e a mortalidade foram avaliados por 12 dias. O delineamento experimental detalha-se na (Fig. 7).

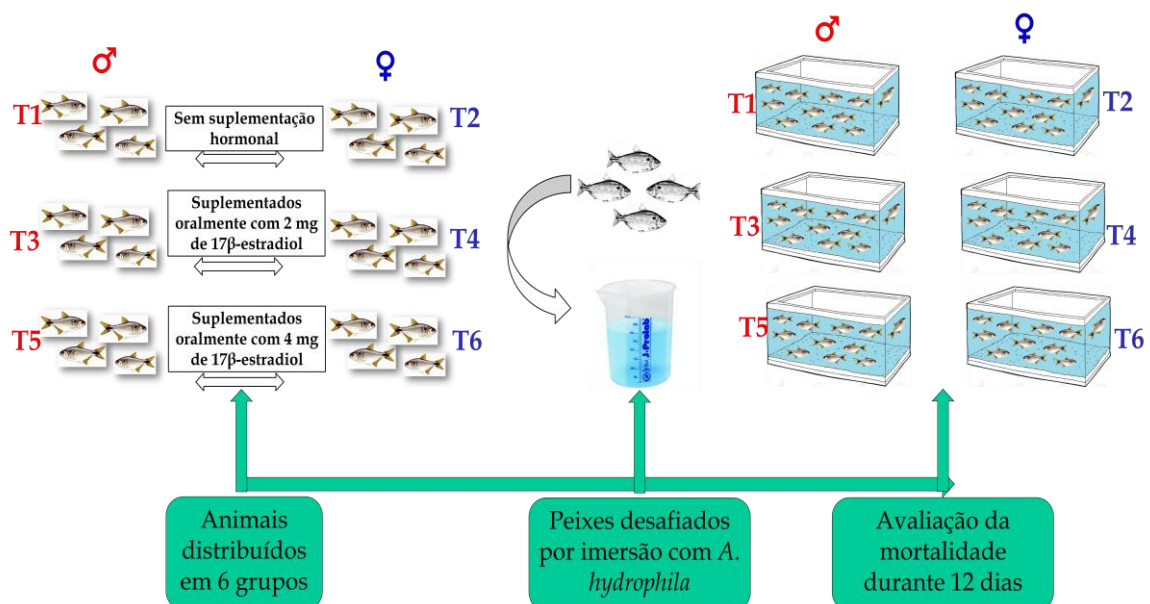


Figura 7. Desenho experimental do segundo experimento: *Astyanax altiparanae* suplementados com diferentes concentrações de 17β -estradiol e infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*.

6.2.5 Experimento 2.

Avaliação da susceptibilidade de *Astyanax altiparanae* à infecção experimental por imersão com *Aeromonas hydrophila* sob diferentes condições de temperatura e pH da água.

6.2.6 Delineamento experimental

Experimento temperatura

Este experimento foi realizado com um total de 256 lambaris *A. altiparanae*, com peso médio $3,98 \pm 1,20$ g e comprimento médio $4,30 \pm 0,41$. Os peixes foram distribuídos em quatro grupos experimentais de 16 animais cada, em duplicata: Grupo T1: 21°C; T2: 25°C; T3: 29°C; T4: 33°C (animais infectados com bactéria). As temperaturas dos diferentes grupos foram escolhidas levando em consideração os valores ideais de temperatura para lambari propostos por Porto-Foresti, et al. (2005) e adicionando temperaturas fora da faixa de conforto.

Para o controle da temperatura de cada um dos aquários foram utilizados termostatos regulados a diferentes níveis em sala climatizada. O pH da água foi mantido constante 7-7,4. Como grupos controle foram considerados os mesmos tratamentos, mas sem adição da bactéria, sendo substituída por PBS estéril. A infecção foi realizada por imersão em todos os grupos (1L de água com 45mL de *A. hydrophila* diluída em PBS (1,780 densidade óptica DO_{600nm}). Também foram realizados grupos controle para todos os tratamentos, porém não houve mortalidade ou sinais clínicos em nenhum deles (dados não apresentados). A mortalidade após desafio foi avaliada por 12 dias.

Experimento pH

Foram utilizados alevinos de lambari do rabo amarelo, *Astyanax altiparanae* distribuídos em 4 grupos experimentais de 16 animais cada, em

duplicata. Para a manipulação do pH da água foi utilizado ácido clorídrico (HCL) e hidróxido de alumínio. Os grupos foram conformados da seguinte maneira: Grupo T1: pH 5; T2: pH 6; T3: pH 7; T4: pH 8 (animais infectados com bactéria), a temperatura foi mantida constante: 28°C. Os valores de pH escolhidas para os diferentes grupos foram levando em consideração os valores adequados para lambari propostos por Porto-Foresti, et al. (2005) e adicionando pH fora da faixa de conforto.

Como grupos controle foram considerados os mesmos tratamentos, porém sem adição da bactéria, sendo substituído por PBS estéril. A infecção foi realizada por imersão em todos os grupos (1L de água com 45mL de *A. hydrophila* diluído em PBS (1,780-1,790 densidade óptica DO_{600nm}). Também foram realizados grupos controle para todos os tratamentos, porém não houve mortalidade ou sinais clínicos em nenhum deles (dados não apresentados). A mortalidade após desafio foi avaliada por 12 dias.

6.2.7 Bactéria, preparação do inóculo.

Uma cepa patogênica de *A. hydrophila* (09AH1) isolada naturalmente de um surto de doença em tilápias do Nilo (YUNIS-AGUINAGA et al., 2016) foi utilizada nas infecções experimentais. A cepa foi caracterizada geneticamente, e confirmadas por sequenciamento, alcançando 98% de similaridade de 98% com a cepa CP007518.2 (número de acesso).

As bactérias foram mantidas congeladas a -80°C em caldo de tripticaseína de soja (TSB, Kasvi, São José do Pinhais, Brasil) suplementado com glicerol a 15% (v / v). Para a reativação da cepa esta foi cultivada em agar tripticaseína de soja (TSA, Kasvi) e incubada a 28°C por 24h. A cepa foi reativada *in vivo* por meio da inoculação intracelomática em lambaris e

posterior reisolamento (três passagens). As suspensões bacterianas foram preparadas transferindo uma única colônia de *A. hydrophila* para tubos Falcon com 50mL de TSB e reincubadas a 28°C em um agitador bacteriológico (New Brunswick Scientific, New Jersey, EUA). Vinte e quatro horas após a incubação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas (Sorvall Legend Mach 1.6R, Alemanha) a 10,000 g / 10 min / 4°C, duas vezes. A massa bacteriana foi ressuspensa em tampão fosfato salino (PBS). A concentração bacteriana foi estimada por espectrofotometria e confirmada pela determinação de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de diluições seriadas da cultura original, para o experimento 1 (1,380 densidade óptica DO_{600nm}-1,13 × 10⁸ UFC mL⁻¹), experimento 2 (1,780 densidade optica DO_{600nm}-5×10⁹).

6.2.8 Infecção experimental

Os peixes de cada grupo foram transferidos para béqueres de vidro de 2L contendo 1L de água livre de cloro com 45mL de solução de *A. hydrophila* suspensa em PBS estéril e mantidos submersos por 2h, com aeração constante. A seguir, os peixes retornaram aos aquários. Nos grupos não infectados, as bactérias foram substituídas por 45mL de PBS estéril. Amostras de brânquias, rim cranial, fígado e pele de peixes moribundos foram cultivadas em placas de TSA e incubadas por 24h a 28°C, em condições de aerofilia para corroborar a causa da morte. Amostras aleatórias das colônias bacterianas foram confirmadas como *A. hydrophila* por meio de análises bioquímicas e moleculares.

6.2.9 Exame clínico, alterações macroscópicas

Os animais foram avaliados permanentemente ao longo do experimento, para verificar possíveis alterações macroscópicas e de comportamento clínico.

6.2.10 Sobrevivência acumulada

A porcentagem de mortalidade acumulada de cada grupo foi avaliada por 12 dias considerando a fórmula: $[(n^{\circ} \text{ mortes} / n^{\circ} \text{ total de animais}) * 100]$. Os peixes que sobreviveram e peixes moribundos com sinais clínicos irreversíveis foram submetidos a eutanásia por meio de overdose em solução alcoólica de benzocaína (Sigma-Aldrich).

6.2.11 Avaliação microbiológica

Amostras de brânquias, rins, fígado e pele de animais moribundos foram semeadas em placas de TSA e incubadas por 24h a 28°C, em aerofilia (NIELSEN et al., 2001). Amostras aleatórias das colônias bacterianas típicas foram confirmadas como *A. hydrophila* por testes bioquímicos e moleculares.

6.2.12 Histopatologia

Fragmentos de brânquias, rins, baço e fígado foram coletados, fixados em solução de formalina tamponada por 24h e posteriormente transferidos para etanol a 70%. Estas amostras foram submetidas a processamento histológico como descrito no experimento 1.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Primeiro experimento

As alterações macroscópicas causadas pelo desafio com *A. hydrophila* iniciaram 24h após banho de imersão. Os peixes apresentaram aumento na secreção de muco, erosões, úlceras e púrpuras hemorrágicas na pele (Fig. 8-A), assim como fígado pálido (Fig. 8-B). Também observou-se congestão de brânquias e áreas de necroses (Fig. 8-C).

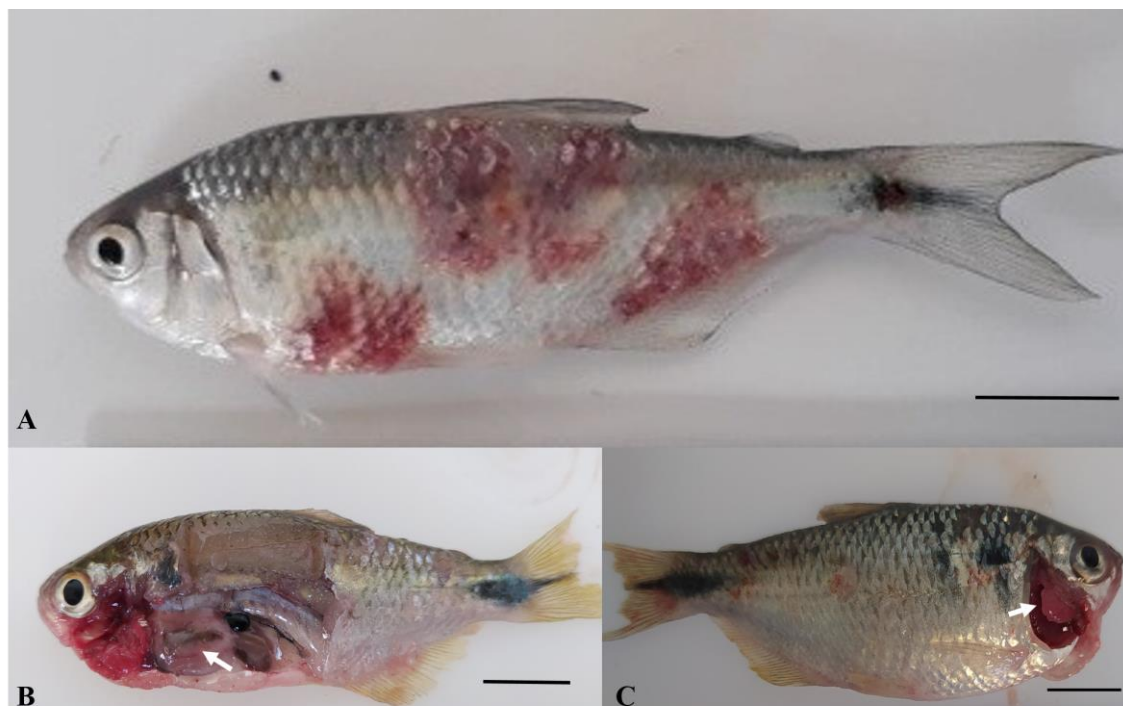


Figura 8. Alterações macroscópicas de *Astyanax altiparanae* desafiadas com *Aeromonas hydrophila*. (A) Lesões ulcerativas e hemorrágicas. (B) Fígado pálido (seta branca). (C) Brânquias área de necrose (seta branca). Barra 1 cm.

A porcentagem de sobrevivência foi calculada 12 dias após o desafio, sendo 81,75% no tratamento T3♂, 68,75% nos tratamentos T1♂ e T5♀, 50,0% no tratamento T4♀, 31,25% no tratamento T6♀, e 25,0% no tratamento T2♀, (Tabela 1). As fêmeas apresentaram taxa de sobrevivência significativamente menor do que os machos ($P < 0,05$) quando comparadas nos três tratamentos (T1-T3-T4). A mortalidade nas fêmeas se estabilizou no sétimo dia para o tratamento T2, no sexto dia para o tratamento T6 e no quinto dia para o tratamento T4. Nos machos a mortalidade ficou estável a partir do quinto dia para o tratamento T1, no quarto dia para o tratamento T5 e no terceiro dia para o tratamento T3 (Fig. 10). Não houve diferença significativa entre os três tratamentos do mesmo sexo ($P > 0,05$).

Tabela 1. Sobrevivência de *Astyanax altiparanae* após suplementação com estradiol e desafio bacteriano.

Grupo	Mortalidade Acumulada (%)	Sobrevivência acumulada (%)
T1♂	31,25	68,75
T2♀	75,00	25,00
T3♂	18,75	81,25
T4♀	50,00	50,00
T5♂	31,25	68,75
T6♀	68,75	31,25

Na histopatologia dos animais sobreviventes observaram-se úlceras e hemorragia na pele, assim como infiltrado inflamatório na derme e camada muscular (Fig. 9-A). No intestino observou-se hiperplasia de células caliciformes e infiltrado inflamatório (Fig. 9-B). No fígado, observou-se leve a moderada congestão, hemorragia e degeneração hidrópica (Fig. 9-C). Finalmente, nas brânquias, os animais apresentaram moderada a severa congestão (Fig. 9-D), leve hemorragia e leve perda de lamelas secundárias.

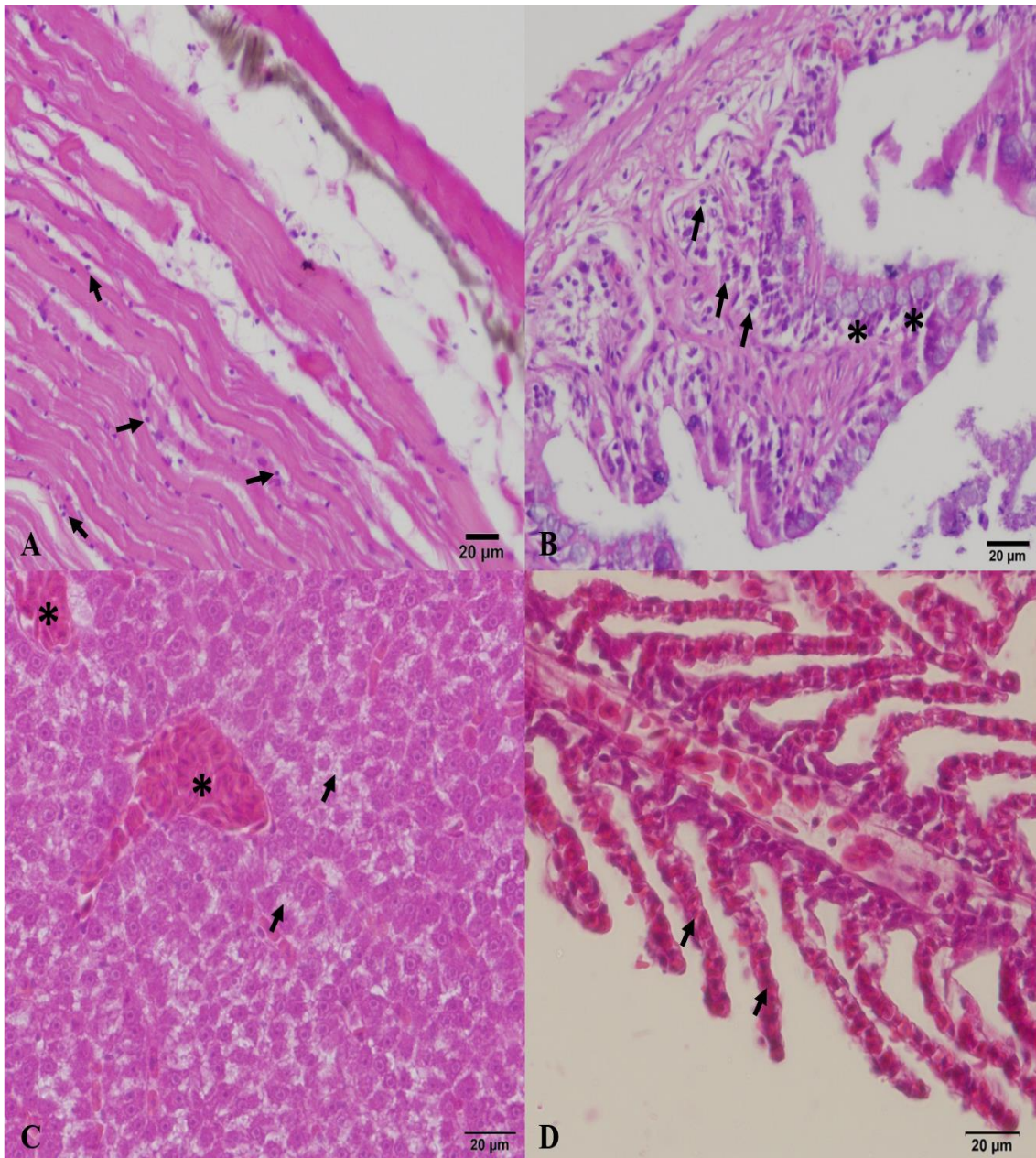


Figura 9. Alterações histopatológicas em *A. altiparanae* sobreviventes à infecção experimental via banho com *A. hydrophila*. A. Pele: Infiltrado inflamatório na derme e músculo (setas), B. Intestino: Hiperplasia de células caliciformes(*) e infiltrado inflamatório (setas), C. Fígado: congestão da veia central(*) e degeneração hidrópica (setas), D. Brânquias: Congestão de lamelas branquiais (setas). Coloração H&E.

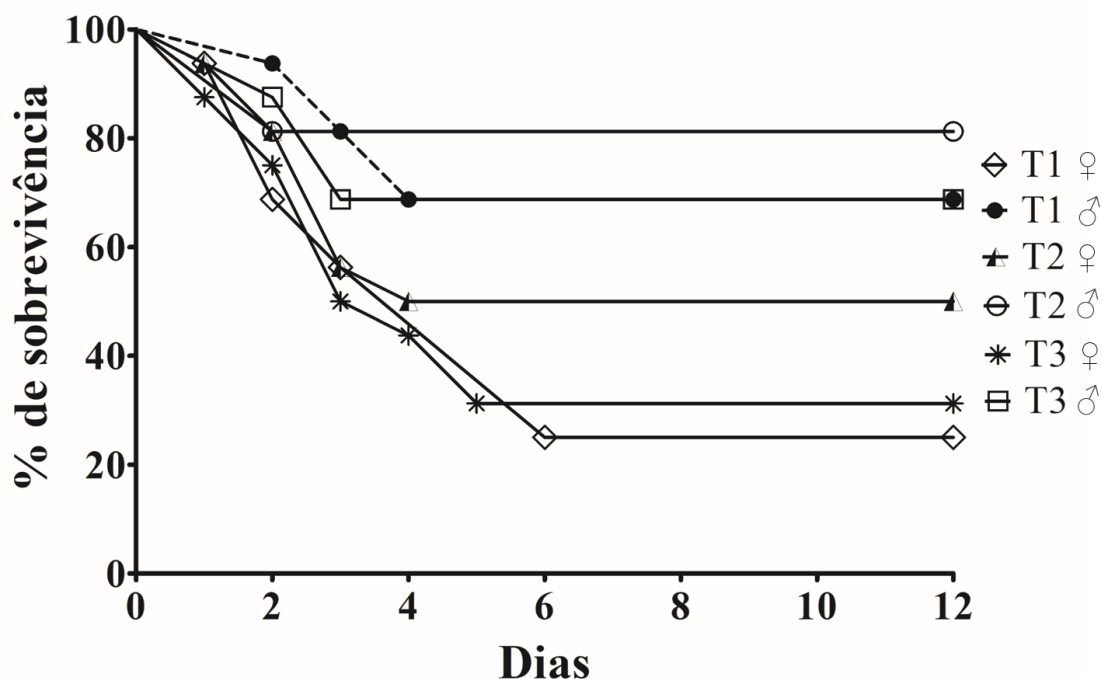


Figura 10. Sobrevivência 12 dias após desafio por imersão com *A. hydrophila* em lambaris de rabo amarelo suplementados com diferentes quantidades de 17β -estradiol. Grupo T1♀-T1 ♂ (0 mg kg⁻¹), T2♀-T2 (2 mg kg⁻¹), T3♀-T3 (4 mg kg⁻¹).

6.3.2 Segundo experimento

O tratamento mantido a 21°C alcançou mortalidade de 31,25%, enquanto que os grupos mantidos a 25, 29 e 33°C obtiveram mortalidade acumulada de 6,25; 18,75 e 50% respectivamente. A menor taxa de sobrevivência foi do grupo mantido a 33°C e a maior a do grupo mantido a 25°C (Fig. 11), com diferença significativa na sobrevivência acumulada após infecção entre ambos ($p=0,0060$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos restantes. A mortalidade iniciou 24h após infecção no grupo mantido na temperatura mais alta e às 48h nos grupos restantes. A mortalidade se estabilizou entre os dias 5 e 9 após infecção em todos os grupos.

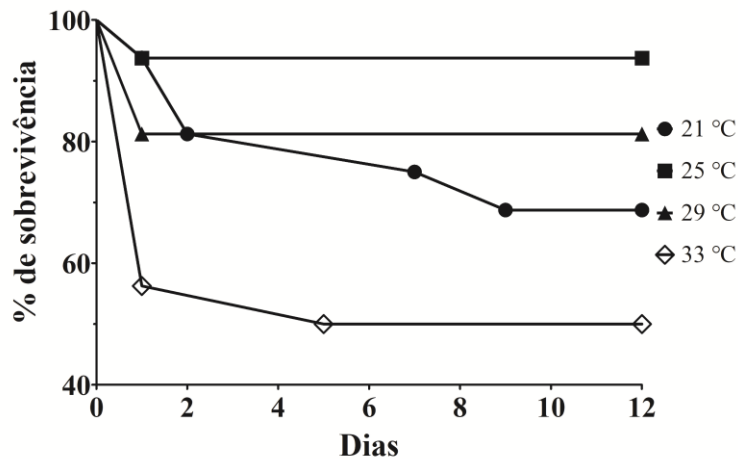


Figura 11. Sobrevivência de *A. altiparanae* mantidos sob diferentes temperaturas após desafio por imersão com *A. hydrophila* por 12 dias. Grupo T1: 21°C; T2: 25°C; T3: 29°C; T4: 33°C.

No experimento referente ao pH da água foi observado que os peixes mantidos em pH 5 não apresentaram mortalidade após infecção, enquanto que os grupos mantidos em pH 6, 7 e 8 alcançaram taxas de mortalidade acumuladas de 12,5; 6,25 e 37,5% respectivamente. A menor taxa de sobrevivência foi do grupo sob pH 8 e a maior a do grupo com pH 5 (Fig. 12), porém não houve diferença estatística (após correção do valor de P para comparações múltiplas $P=0,0083$) na sobrevivência acumulada após infecção entre ambos ($P=0,0095$). Adicionalmente não foram observadas diferenças significativas entre os grupos restantes, com valores de P foram muito superiores ($P>0,044$).

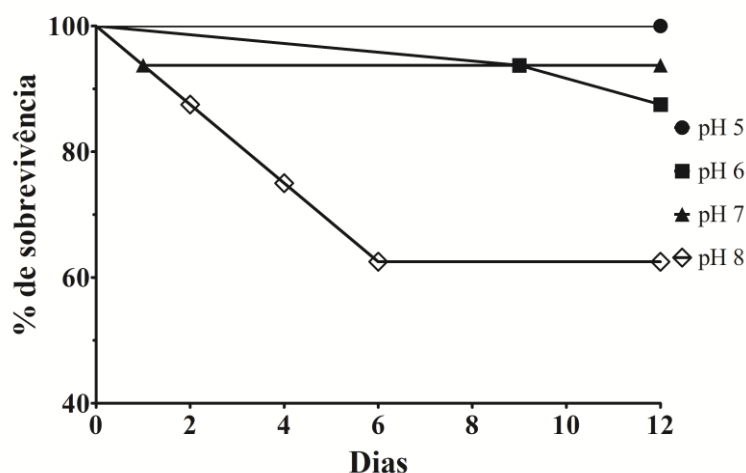


Figura 12. Sobrevivência de *A. altiparanae* mantidos sob a diferentes pH da água após desafio por imersão com *A. hydrophila* por 12 dias. Grupo T1: 5 pH; T2: 6 pH; T3: 7 pH; T4: 8 pH.

6.4 DISCUSSÃO

6.4.1 Experimento 1

As lesões macro e microscópicas observadas podem ser atribuídas aos diversos fatores de virulência da bactéria (BOIJINK & BRANDÃO, 2001; TOMÁS, 2012). Toxinas hemolíticas e proteolíticas da *A. hydrophila* produzem ruptura capilar, resultando nesse tipo de lesões necrohemorrágicas (STOSKOPF, 1993; THUNE, 1993; PAVANELI et al., 1998). Os distúrbios circulatórios encontrados nos lambaris infectados com *A. hydrophila* são achados típicos em peixes tropicais natural ou experimentalmente infectados (STOSKOPF, 1993; BARCELLOS et al., 2008; CLAUDIANO et al., 2019; MARINHO-NETO et al., 2019).

Neste estudo constatou-se que 24h após do banho por imersão foi possível isolar a bactéria em pele, brânquias, fígado e rim cranial de peixes moribundos. *A. hydrophila* distribui-se rapidamente pelo organismo após infecção experimental, como descrito por Marinho-Neto et al. (2019) no isolamento de *A. hydrophila* 9h após infecção via intraperitoneal em 100% dos tecidos isolados de pacus, e

inclusive sendo detectada 1h após infecção em baixas porcentagens no baço e no rim.

A rápida dispersão da bactéria, somada aos fatores acima citados, explicam as alterações degenerativas e circulatórias observadas na histopatologia deste estudo. Nos lambaris infectados via banho observaram-se sinais clínicos e lesões semelhantes relatados para infecções naturais e experimentais por *A. hydrophila* em outros teleósteos tropicais, como tilápia do Nilo (YUNIS-AGUINAGA et al., 2016), jundiá, *Rhamdia quelen*, (DE LIMA et al., 2001; BARCELLOS et al., 2008), matrinxã, *Brycon amazonicus*, (OLIVEIRA et al., 2011), betas (HONORATO et al., 2014) e pacu, *Piaractus mesopotamicus* (CLAUDIANO et al., 2019; MARINHO-NETO, 2019). Este estudo é o primeiro que descreve as lesões histopatológicas após desafio por imersão com *A. hydrophila* no lambari de rabo amarelo.

Diversos fatores afetam a resposta imune dos peixes. No segundo experimento, foi observada diferença estatística na sobrevivência entre machos e fêmeas, fato que poderia ser explicado pelos eventos reprodutivos diferentes entre machos e fêmeas como a maturação de ovócitos nas fêmeas. Evento que demanda elevado gasto de energia e nutrientes em detrimento de outras funções como o sistema imune. O elevado valor do gasto energético foi confirmado em *Oreochromis niloticus* confirmando-se que os requisitos de energia e proteína total para a manutenção e custo da composição corporal das fêmeas, além da quantidade e do conteúdo dos ovos é maior do que os machos (LUPATSCH et al., 2010).

Neste experimento também foi perceptível tendência ao incremento na mortalidade nas fêmeas de lambaris suplementadas com doses maiores de

17 β -estradiol, o que poderia estar relacionado aos efeitos imunossupressores do estradiol. Níveis baixos de estrogênios nos peixes podem estimular a resposta imune e pelo contrário níveis altos de estrogênio atuam como imunossupressores (SZWEJSER et al., 2017). Wenger et al. (2011) descreveram menor capacidade na ativação da resposta imune e menor sobrevivência em trutas alimentadas com 20 mg E2/kg por 2 semanas a curto prazo de 17- β estradiol e posteriormente desafiadas com *Yersinia ruckeri*. A suplementação com estradiol provou interferir negativamente nos níveis de IgM no plasma de douradas injetadas com estradiol e desafiadas com *Edwardsiella ictaluri* (CUESTA et al., 2007).

6.4.2 Experimento 2

A zona de conforto térmico dos lambaris encontra-se na faixa de 25 a 28°C (PORTO-FORESTI et al., 2005). Peixes mantidos fora da sua faixa de conforto térmico sofrem estresse, que afeta processos celulares e defesa humoral, principalmente aqueles que dependem de energia metabólica (BALM, 1997), causando imunossupressão. No presente experimento foi observado que lambaris infectados com *A. hydrophila* e mantidos nas temperaturas mais altas apresentaram maior letalidade provavelmente explicadas pela imunossupressão causada pela liberação de cortisol produto do estresse térmico (FRASCÁ-SCORVO et al., 2001; BELO et al, 2005, 2012).

Exposição crônica às temperaturas altas, não letais, afetam os parâmetros imunológicos tais como a atividade fagocítica de macrófagos como observado em kinguios, *Carassius auratus* infectados com *A. hydrophila* e mantidos em distintas temperaturas da água (RAHMAN et al., 2001). Adicionalmente, a temperatura da água tem mostrado regular a ativação de

leucócitos sanguíneos e do baço após desafio com *Aeromonas salmonicida* em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (KOLLNER & KOTTERBA, 2002). Assim, suspeita-se, que de forma análoga aos experimentos citados, as altas temperaturas podem ter induzido uma queda na resposta de diversos parâmetros da imunidade innata nos lambaris, que contribuiu com a exacerbada mortalidade. Entretanto, estes dados não foram corroborados no presente estudo.

Por outro lado, a temperatura de cultivo bacteriano modifica a expressão de proteínas na parede celular de *A. hydrophila*, fato corroborado em isolados de humanos e peixes (MATEOS et al., 1993; RAHMAN et al., 2001). Proteínas de membrana bacterianas conhecidas como OMPs regulam a patogenicidade das bactérias (BIOSCA & AMARO 1991), desta forma modificações na sua estrutura induzidas pela temperatura do ambiente podem estar associadas ao o incremento da sua patogenicidade.

A *A. hydrophila* é considerada como patógeno oportunista e é possível isolá-la na água de viveiros ou tanques de peixes (PEIXOTO et al., 2012). Pesquisas *in vitro* tem mostrado que cepas de *A. hydrophila* apresentam a melhor taxa de crescimento em níveis de pH na faixa entre 6.5 e 7.2. No presente experimento observou-se menor severidade da infecção por *A. hydrophila* em lambaris mantidos no grupo T1 com menor pH, o que poderia ser explicado pela menor taxa de crescimento das bactérias em contato com níveis baixos de pH na água. Palumbo et al. (1985) mencionaram que o crescimento da bactéria é retardado em pH 5.5 e as contagens bacterianas começam diminuir em pH 4.5. Adicionalmente, a menor mortalidade no grupo T1 também poderia ser explicado pelo fato dos peixes serem submetidos a

menor estresse produto da sua tolerância a ambientes ácidos, em comparação dos ambientes alcalinos. Segundo Porto-Foresti, et al. (2005), as condições de qualidade de água de cultivo recomendadas para espécies de *Astyanax* estão na faixa de 6,5 a 8,0. Pelo contrário, o grupo T4 mantido sob pH 8 apresentou maior mortalidade, provavelmente devido a alterações na função respiratória dos peixes induzidas em ambientes alcalinos (Das et al., 2006). Wood (2001) observaram que peixes expostos em ambientes alcalinos, podem sofrer distúrbios no fluxo interno de Na^+ e Cl^- , devido a inibição nas trocas de íons nas brânquias.

6.5 CONCLUSÕES

Concluiu-se, que a suplementação de estradiol nas dietas de lambari de rabo amarelo interferiu na resposta dos animais após desafio bacteriano com *A. hydrophila*, particularmente na dose mais alta 4mgkg^{-1} . Assim, recomenda-se estabelecer protocolos de feminização para a espécie com doses mais baixas do hormônio a fim de garantir que populações monosexo.

Por outro lado, foi demonstrado que lambaris mantidos nas temperaturas e pH mais altos apresentaram maior mortalidade quando desafiados com *A. hydrophila* em condições experimentais, o que indica que variações nestes parâmetros poderiam comprometer a saúde da espécie ter um efeito imunossupressor, e aumentar a susceptibilidades a infecções bacterianas como *A. hydrophila*.

6.6 REFERÊNCIAS

- BALM, P. H. M. Immune-endocrine interactions. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: Cambridge University Press, p. 195-221. 1997.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; RUSHEL, L.; MOTA, A. C.; RITTER, F. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 355-363, 2008.
- BELO, M. A. D. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, 133(2-3), 146-154. 2005.
- BELO, M. A. D. A.; MORAES, J. R. E. D.; SOARES, V. E.; MARTINS, M. L.; BRUM, C. D.; MORAES, F. R. D. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47(7), 1015-1021. 2012.
- BIOSCA, E. G.; AMARO, C. Siderophore and related outer membrane protein in *Vibrio* sp. which are potential pathogens of fish and shell fish. **J. Fish Dis.** 14, 249±263. 1991.
- BOIJINK, S.L.; BRANDÃO, D. A. Inoculation with *Aeromonas hydrophila* bacteria and the survival of juvenile jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodida). **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 503-507, 2001.

CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARINHO-NETO, F. A.; MIRANDA, R. L.; MARTINS, I. M.; OTANI, F. S.; MUNDIM, A.V.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus* hematological and immune variables. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 259-265, 2019. doi: 10.1016/j.fsi.2019.01.044.

CUESTA, A.; VARGAS-CHACOFF, L.; GARCIA-LOPEZ, A.; ARJONA, F. J.; MARTINEZRODRIGUEZ, G.; MESEGUER, J.; MANCERA, J. M.; ESTEBAN, M. A. Effect of sex steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 693–700, 2007.

DAS, P. C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J. K. Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 80-87, 2006.

DA SILVA, N. J. R.; LOPES, M. C.; FERNANDES, J. B. K.; HENRIQUES, M. B. Caracterização dos sistemas de criação e da cadeia produtiva do lambari no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, 41(9), 17-28. 2011.

DE LIMA BOIJINK, C.; 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, n. 4, p. 687-690, 2001.

FRASCÁ-SCORVO, C.M. D.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B. Comportamento alimentar do matrinxã (*Bryconcephalus*) no período de

temperaturas mais baixas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2001.

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

HONORATO, C. A.; FRAGA, T. L.; NASCIMENTO, C. Q.; DA SILVA, N. F. Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em *Betta splendens*—alterações histopatológicas nas brânquias. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, p. 49-53, 2015.

KÖLLNER, B.; KOTTERBA, G. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, 12(1), 35-48. 2002.

LUPATSCH, I.; DESHEV, R.; MAGEN, I. Energy and protein demands for optimal egg production including maintenance requirements of female tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 763-769, 2010.

MARINHO-NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVA-QUIROZ, V. A.; KOBASHIGAWA, K. K.; CRUZ, N. R.; MORAES, R. F.; MORAES, J. R. Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. **PloS one**, v. 14, n. 9, e0222626, 2019.

MARCOGLIESE, D. J. The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 27, p. 467-484, 2010.

MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; TAVARES-DIAS, M.; FENERICK, J. R. J.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69. p. 957-962, 2009.

MATEOS, D.; ANGUITA, J.; NAHARRO, G.; PANIAGUA, C. Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Bacteriology**, 74(2), 111-118. 1993.

NAKAMURA, M.; BHANDARI, R. K.; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, 28(1-4), 113-117. 2003.

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.

OLIVEIRA, S. R.; SOUZA, R. T. Y. B.; BRASIL, E. M.; ANDRADE, J. I. A.; NUNES, É. S. S.; ONO, E. A.; AFFONSO, E. G. LD50 of the bacteria *Aeromonas hydrophila* to matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 2, p. 321-326, 2011.

PALUMBO, S. A.; MORGAN, D. R., BUCHANAN, R. L. Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Food Science**, 50(5), 1417-1421. 1985.

- PEIXOTO, L. J. S.; SÁ, M. C. A.; GORDIANO, L. A., COSTA, M. M. *Aeromonas spp.*: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, 79(3), 453-461.2012.
- PAVANELI, G. C.; EIRAS J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de Peixes. Profilaxia, Diagnóstico e tratamento. Editora da Universidade Estadual de Maringá. Brasil, 1998.
- PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). IN: Espécies nativas para piscicultura. Santa Maria: Ed UFMS, 2005.
- RAHMAN, M. H.; SUZUKI, S.; KAWAI, K. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. **Journal of Applied Ichthyology**, 17(6), 282-285. 2001.
- SARKAR, A.; SAHA, M.; ROY, P. Identification and Typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR Fingerprinting. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 3, p. 142, 2012.
- SATO, Y; SAMPAIO, E.V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, p. 267- 273, 2006.
- STOSKOPF, M. K. **Bacterial diseases of goldfish, koi, and carp**. In: Stoskopf, M.K. (ed.) Fish Medicine, W.B. Saunders Company: Philadelphia, 1993.
- SZWEJSER, E.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. L.; MACIUSZEK, M.; CHADZINSKA, M. Estrogen-dependent seasonal adaptations in the immune response of fish. **Hormones and behavior**, v. 88, p. 15-24, 2017.

THUNE, R. L.; STANLEY, L. A.; COOPER, R. K. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warm water fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 3, p. 37-68, 1993.

TOMÁS, J. M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. **ISRN. Microbiology**, 2012, P. 1 – 22, 2012.

VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., & PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018. doi: 10.1111/raq.12164.

WENGER, M.; SATTTLER, U.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, E.; SEGNER, H. 17Beta-estradiol affects the response of complement components and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenged by bacterial infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 1, p. 90-97. 2011.

WOOD, C.M., 2001. Toxic responses of the gill. In: Schlenk, D.S., Benson, W.H. (Eds.), Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, vol. 1. Taylor and Francis, London, pp. 1 – 89.

YUNIS-AGUINAGA, J., FERNANDES, D. C., ETO, S. F., CLAUDIANO, G. S., MARCUSO, P. F., MARINHO-NETO, F. A. & DE MORAES, J. R. E. Dietary camu camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p. 284-291, 2016.

ANEXO 1. Certificado da comissão de ética no uso de animais (capítulo 1)



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



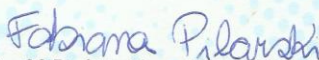
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Fatores predisponentes na infecção experimental com *Aeromonas hydrophila* em *Astyanax altiparanae***", protocolo nº 014773/19, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Julieta Rodini Engrácia de Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de novembro de 2019.

Vigência do Projeto	30/11/2019 a 30/06/2020
Espécie / Linhagem	<i>Astyanax altiparanae</i> / Lambari
Nº de animais	600 peixes
Peso / Idade	5 g – 10 g
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 14 de novembro de 2019.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

ANEXO 2. Certificado da comissão de ética no uso de animais (capítulo 2)



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Caracterização da infecção experimental por imersão de *Aeromonas hydrophila* em *Astyanax altiparanae* suplementadas oralmente com estradiol**”, protocolo nº 11235/18, sob a responsabilidade da Profª Drª Julieta Rodini Engrácia de Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de setembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/10/2018 a 01/11/2020
Espécie / Linhagem	Lambari (<i>Astyanax altiparanae</i>)
Nº de animais	300 peixes
Peso / Idade	5g a 10g
Sexo	Ambos os sexos
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 06 de setembro de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

ANEXO 3. Artigo publicado na revista Aquaculture Reports

Aquaculture Reports 16 (2020) 100285



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqrep



Influence of hand net mesh type and sex on experimental infection with *Aeromonas hydrophila* in Brazilian native fish *Astyanax altiparanae*

Norquis Caled Alvarez-Rubio^a, Jefferson Yunis-Aguinaga^a, Daniel L. Cala-Delgado^a, Victor Alexander Cueva Quiroz^a, Bruno Luis Miani Verri^a, Fernando Carlos Ramos Espinoza^a, Julieta Rodini Engracia de Moraes^{a,b,*}

^a Aquaculture Center of Unesp, São Paulo State University (Unesp), Via Prof. Paulo Donato Castellane, Km 05, Jaboticabal, SP: 14.884-900, Brazil

^b Department of Veterinary Pathology, São Paulo State University (Unesp), Jaboticabal, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Landnet
Native fish
Bacterial infection
Aeromonas
Fluorescein

ABSTRACT

Farmed fish are permanently exposed to management procedures such as netting that can result in stress, skin injuries and subsequent secondary infections. The type of mesh material can modulate the magnitude of netting injury, yet there is scarce information on this topic for aquaculture species. The aim of this study was to evaluate the influence of net material on experimental infection by *Aeromonas hydrophila* using male and female *Astyanax altiparanae*, yellowtail tetra, as an infection model. Two hundred and fifty six *A. altiparanae* were distributed into 16 groups considering sex, types of net material (nylon, polypropylene, polyethylene, and a control group handled without net), and immersion challenge with *A. hydrophila*. Prior to infection, fish were anesthetized and submitted to netting for 30 s. Immediately, a fluorescein bath was applied under UV light to detect skin lesions. Later, fish were infected by immersion challenge in diluted bacterial solution, while control groups were immersed in sterile PBS. It was verified that the fish handled with nylon net mesh showed more extensive lesions than groups handled with polypropylene and polyethylene nets. Survival after infection was significantly lower in fish previously handled with nylon net when compared to all other groups, while no differences were found between polypropylene, polyethylene nets or fish handled by hand. There was no gender influence on lesions or mortality. It was concluded that yellowtail tetra is sensitive to netting and polypropylene and polyethylene capture nets should be used for handling this species. Additionally, nylon hand nets should be banned to avoid injuries that could serve as gateways for opportunistic pathogens such as *A. hydrophila*.

1. Introduction

Farmed fish are constantly exposed to a variety of management procedures, such as netting, holding, transporting, air exposure and confinement that may compromise fish homeostasis (Dror et al., 2006). Netting induces a pronounced stress response (Brijs et al., 2019) and can result in different degrees of injuries on fish skin increasing the risk of secondary fungal and bacterial infections (Conte, 2004; Colotello and Cooke, 2011).

Net mesh used in fisheries and aquaculture can vary by material, although the most common types are nylon, polypropylene, polyethylene and thick rubber (Lizée et al., 2018). The type of mesh material can modulate the magnitude of netting injuries. Among mesh material, nylon has proved to induce greater damage on fish skin during net retention compared to soft textile net (Gallardo et al., 2010), rubber

or polypropylene (Barthel et al., 2003; Lizée et al., 2018). However, most studies on net material are related to fisheries with long netting times, while there is scarce information for aquaculture or shorter procedures.

Skin damage such as induced by netting is often grossly visible and thus easily identified, however fish skin can become ulcerated without displaying any obvious signs of damage (Colotello & Cooke, 2011). Fluorescein, a yellow, relative nontoxic vital dye, can penetrate damaged epithelium without binding to intact tissues (Bartlett et al., 1996). This dye has been used to detect damage on fish skin before it is visible to the naked eye for salmonids and other farmed species with surgical skin injuries (Noga and Udomkumsorn, 2002), freshwater sport fish species with netting injuries (Colotello & Cooke, 2011) and for pacu, *Piaractus mesopotamicus* experimentally infected with *A. hydrophila* (Marcusso et al., 2014).

* Corresponding author at: Aquaculture Center of Unesp, São Paulo State University (Unesp), Via Prof. Paulo Donato Castellane, Km 05, Jaboticabal, SP: 14.884-900, Brazil.

E-mail address: julietamoraes77@gmail.com (J.R.E. de Moraes).

<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100285>

Received 1 November 2019; Received in revised form 28 January 2020; Accepted 28 January 2020

2352-5134/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).