

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

**ESTUDO DO EFEITO MODULADOR DO MACROLÍDEO
TILOSINA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA DE
TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*), VACINADAS E
DESAFIADAS COM *Streptococcus agalactiae***

**Vanessa Pavesi de Faria
Médica Veterinária**

2015

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

**ESTUDO DO EFEITO MODULADOR DO MACROLÍDEO
TILOSINA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA DE
TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*), VACINADAS E
DESAFIADAS COM *Streptococcus agalactiae***

Vanessa Pavesi de Faria

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciência Agrárias e Veterinária – Unesp,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de mestre
em Medicina Veterinária, Área: Patologia
Animal

2015

F224e Faria, Vanessa Pavesi de
Estudo do efeito modulador do macrolídeo tilosina na reação
inflamatória aguda de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*),
vacinadas e desafiadas com *Streptococcus agalactiae* / Vanessa
Pavesi de Faria. -- Jaboticabal, 2015
xviii, 57 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Marco Antonio de Andrade Belo
Banca examinadora: Fabiana Pilarski, Wilson Gómez Manrique
Bibliografia

1. Tilapicultura. 2. Estreptococose. 3. Macrolídeos. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO DO EFEITO MODULADOR DO MACROLÍDEO TILOSINA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*), VACINADAS E DESAFIADAS COM *Streptococcus agalactiae*

AUTORA: VANESSA PAVESI DE FARIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Farmacologia e Toxicologia Animal, UNICASTELO, Descalvado, SP

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI
Centro de Aquicultura / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Prof. Dr. WILSON GOMEZ MANRIQUE
Departamento de Patologia Veterinária, UNICASTELO, Descalvado, SP

Data da realização: 04 de dezembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Vanessa Pavesi de Faria - Natural de São Carlos SP, nascida em 05 de maio de 1983, Médica Veterinária, mestranda em patologia veterinária. Ingressou em 2008 no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO, Campus Descalvado (SP), bolsista Pro-Uni, concluindo a graduação no ano de 2013. No período de graduação exerceu atividades de pesquisa junto ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal da UNICASTELO, obtendo por dois anos consecutivos bolsa de iniciação científica da Fapesp (2011 a 2013), atuando na área de fisiopatologia da reação inflamatória em peixes teleósteos. Atualmente, mestranda com Bolsa FAPESP pelo Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Jaboticabal, exercendo atividades de pesquisa junto ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal da UNICASTELO, participando do Group of Animal Pharmacology.

“Aos outros eu dou o direito de ser como são, a mim, dou o dever de ser cada dia melhor.”

Chico Xavier

Dedico este trabalho...

À Maria, minha mãe, por todo apoio e amor dedicados todos os dias de minha vida para que hoje eu possa estar realizando mais uma etapa. Agradeço pelos ensinamentos e pela educação que alicerçaram a construção do meu caráter. Me sinto privilegiada de tê-la ao meu lado sempre. Você é meu exemplo. Amo você.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por conceder-me o privilégio de realizar o maior experimento, o da vida.

Minha família, que mesmo distante e ciente das dificuldades em dar seguimento à carreira acadêmica, me apoiou e me ensinou a lutar pelos meus objetivos sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo, não apenas pela orientação, mas também pela oportunidade, disposição, paciência, respeito, confiança e amizade.

Agradeço a todos os amigos que sempre me deram força, e me ajudaram quando eu mais precisei, em especial: Roberto Barbuio e Elizabeth Prada Foz, pela amizade e incentivo desde o princípio e pela compreensão, companheirismo, e pela energia boa que vocês sempre me transmitiram. Sem vocês eu não conseguiria.

A uma das melhores equipes de trabalho que alguém poderia ter (ordem alfabética); Alessandra, Betina, Barroco, Ed Johnny, Guadalupe, Melque, Patrícia, Priscila, Simone, Só-dá, Thais, Wilson. Obrigado pela ajuda e parceria, sem vocês nada seria possível.

Aos funcionários e professores do Departamento de Patologia Animal da FCAV - Unesp, especialmente aos queridos: Francisca, Teodoro e Edgar.

Ao Sr. Orivaldo Donizeti dos Santos, pela parceria, paciência e ensinamentos.

A todos colegas do NEPEAM (Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia) pela parceria e auxílio, em especial ao Prof. Dr. Claudinei da Cruz.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro e por acreditar no trabalho.

Sou muito grata a todas essas pessoas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Gerais	2
2.2 Especifico	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Inflamação em Teleósteos	3
3.2. Tilapicultura intensiva no Brasil	4
3.3. <i>Streptococcus agalactiae</i>	5
3.4. Antibióticos Macrolídeos e a Tilosina	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 Peixes e acondicionamento	7
4.2 Delineamento experimental	8
4.3 Dietas experimentais contendo tilosina	9
4.4 Anestesia dos peixes	9
4.5 Produção e administração da vacina contra <i>Streptococcus agalactiae</i>	9
4.6 Desafio bacteriano	10
4.7 Aerocistite infecciosa	10
4.8 Hematologia	11
4.9 Avaliação do bioquímico sérico	12

4.10	Análise da atividade respiratória dos leucócitos e de lisozima sérica	12
4.12	Proteinograma	13
4.13	Avaliação somática dos órgãos	14
4.14	Análise estatística	15
5.	RESULTADOS	16
5.1	Avaliação da Aerocistite infecciosa	16
5.2	Hematologia	18
5.2.1	Série vermelha	18
5.1.2	Leucograma	20
5.1.3	Trombograma	22
5.3	Bioquímica sérico	23
5.4	Atividade respiratória dos leucócitos e de lisozima sérica	25
5.5	Proteinograma	27
5.6	Estudo do índice hepático, esplênico e renal somático	31
6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÃO	47
8.	REFERÊNCIAS	48



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

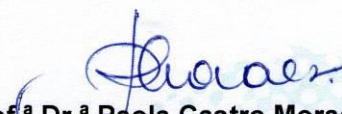


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 01980/14 do trabalho de pesquisa intitulado **“Estudo do efeito modulador do macrolídeo tilosina na reação inflamatória aguda de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), vacinadas e desafiadas com *Streptococcus agalactiae*”**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.


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

ESTUDO DO EFEITO MODULADOR DO MACROLÍDEO TILOSINA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*), VACINADAS E DESAFIADAS COM *Streptococcus agalactiae*

Resumo: O presente estudo avaliou o efeito modulador da tilosina sobre a resposta hematológica de tilápias, administrado de forma oral na ração, sobre a reação inflamatória aguda de tilápias do Nilo, *O. niloticus*, vacinadas e desafiadas com *S. agalactiae*. 104 tilápias (± 300 g) foram acondicionadas aleatoriamente em 13 aquários (n=8), constituindo quatro tratamentos: PF= Padrão Fisiológico (n=8); NT+V= Não tratados com tilosina e vacinados (n=24); NT+NV= Não tratados com tilosina e não vacinados (n=24); T+V= Tratados com tilosina e vacinados (n=24); T+NV= Tratados com tilosina e não vacinados (n=24) Sendo amostrados em três períodos, isto é: seis, 24 e 48 horas pós-desafio (HPD), para a avaliação da resposta no tempo. Bacterina de *S. agalactiae* ($1,0 \times 10^9$ células/mL) foi intramuscularmente administrada 15 dias antes do desafio bacteriano. A aerocistite demonstrou um aumento no número de migração celular conforme a evolução da reação inflamatória ($P < 0.001$), tendo o pico de acúmulo em 48 HPD. Peixes vacinados mostraram maior número de células no exsudato inflamatório em 6 e 48 HPD. No início da reação inflamatória (6 HPD), peixes vacinados e tratados com tilosina apresentaram leucocitose com marcada linfocitose absoluta, monocitose relativa e neutrofilia relativa e absoluta. Tardamente com 48 HPD, estes animais recuperaram os valores leucocitários, apresentando contagens próximas às observadas em animais controles (PF). Na fase inicial 6 HPD, tilápias apresentaram microcitose, aumento de creatinina, da atividade enzimática de fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase, além de alterações no metabolismo energético com diminuição do colesterol, aumento de triglicerídeos e glicose. Com a evolução da infecção 24 e 48 HPD, observou-se macrocitose, diminuições nas contagens de eritrócitos e hemoglobina, sendo estas respostas influenciadas pelo tratamento com tilosina. Os triglicerídeos e colesterol retornaram aos níveis basais em animais vacinados e ocorreu recuperação mais precoce das alterações de creatinina e fosfatase alcalina em tilápias vacinadas e tratadas com tilosina. Tilápias vacinadas e não tratadas apresentaram diminuição significativa na atividade respiratória dos leucócitos (Burst oxidativo), sendo diferente de todos os outros tratamentos em 48 HPD ($P < 0.01$), sendo estes achados influenciados pela número de neutrófilos circulantes. Por outro lado, as tilápias apresentaram pico de concentração sérica de lisozima 24 HPD. A atividade sérica desta enzima foi fortemente influenciada pela contagem de monócitos no sangue e pelo tratamento com tilosina. No proteinograma das tilápias, observou-se aumento significativo nos valores de ceruloplasmina e haptoglobina em peixes vacinados e tratados com 48 HPD. O estudo histopatológico revelou alterações patológicas na mucosa gástrica e intestinal, cérebro, coração, rins e fígado decorrentes da infecção por *S. agalactiae*, porém peixes tratados com tilosina e vacinados apresentaram lesões com menor gravidade. Contudo, a vacinação associada ao tratamento com tilosina auxiliou as respostas de defesa orgânica das tilápias amenizando as alterações deletérias observadas da estreptococose, demonstrando o efeito imunomodulador deste macrolídeo neste teleósteo.

Palavras-Chaves: Tilapicultura, estreptococose, macrolídeos.

**STUDY MODULATOR MACROLIDE TYLOSIN EFFECT IN ACUTE
INFLAMMATORY REACTION OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) ,
VACCINATED AND CHALLENGED WITH *Streptococcus agalactiae***

Abstract: This study evaluated the effect modulator tylosin on hematologic response of tilapia, administered orally in feed, on acute inflammatory response of Nile tilapia, *O. niloticus*, vaccinated and challenged with *S. agalactiae*. 104 tilapia (± 300 g) were placed randomly in 13 aquariums ($n = 8$), constituting four treatments: PF = Standard Saline ($n = 8$); + V NT = not treated with tylosin and vaccinated ($n = 24$); NV + NT = Not treated with tylosin and non-vaccinated ($n = 24$); T + V = treated with tylosin and vaccinated ($n = 24$); T + = NV treated with tylosin and non-vaccinated ($n = 24$). The bacterin of *S. agalactiae* ($1,0 \times 10^9$ cells / ml) was intramuscularly administered 15 days before the bacterial challenge. The aerocistite study showed an increase in cell migration number as the evolution of the inflammatory response ($P < 0.001$) with peak accumulation in 48 of the HPD. Fish vaccinated showed greater number of cells in the inflammatory exudate 6 and 48 HPD. At the beginning of the inflammatory reaction (6 HPD), fish vaccinated and treated with tylosin showed leukocytosis with a marked absolute lymphocytosis on monocyte and neutrophil relative and absolute. Late 48 HPD, these animals recovered the leukocyte values, with scores close to those seen in control animals (PF). In the initial phase 6 HPD, tilapia had microcytosis, increased creatinine, the enzymatic activity of alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase, and changes in energy metabolism with decreased cholesterol, increased triglycerides and glucose. With the evolution of the infection HPD 24 and 48, there was macrocytosis, decreases in hemoglobin and red blood cell counts, these responses are affected by treatment with tylosin. Triglycerides and cholesterol returned to baseline levels in vaccinated animals and occurred earlier recovery of creatinine and alkaline phosphatase changes in vaccinated and treated with tylosin tilapia. Vaccinated tilapia and untreated showed a significant decrease in respiratory activity of leukocytes (oxidative burst), being different from all other treatments in 48 HPD ($P < 0.01$), and these findings influenced by the number of circulating neutrophils. Moreover, tilapia showed peak serum concentration of lysozyme HPD 24. The serum activity of this enzyme was strongly influenced by monocyte count in the blood and the treatment with tylosin. The protein profile of tilapia, there was a significant increase in ceruloplasmin and haptoglobin values in fish vaccinated and treated with HPD 48. Histopathological examination showed pathological changes in the gastric and intestinal mucosa, brain, heart, kidneys and liver resulting from infection with *S. agalactae*, but fish vaccinated and treated with tylosin showed less severe lesions. However, vaccination associated with the treatment with tylosin helped the defense responses of organic tilapia mitigating the harmful changes seen the estreptococose, demonstrating the immunomodulatory effect of macrolide this teleost.

Key Words: tilapia, estreptococose, macrolides, bacterins.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotrasferase
cm	Centímetros
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
dL	Decilitro
DL50	Dose letal em 50%
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FA	Fosfatase alcalina
g	Gramas
H	Hidrogênio
HPD	Horas pós-desafio
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
IS	Índice somático
kcal	Kilocalorias
kg	Kilogramas
L	Litros
M	Mol
mg	Miligramas
min	Minutos
mRNA	RNA mensageiro
mS	Millisimens
Na	Sódio

NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Nitroblue tetrazolium
NT	Não tratados
NV	Não vacinados
NV	Não vacinados
PBD	Panbronquiolite difusa
PBS	Tampão salina fosfato
PC	Peso corporal
PCR	Reação em cadeia
PF	Padrão fisiológico
PFA	Proteína de fase aguda
PGE 2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PO	Peso do órgão
PO	Fosfato
Prob.	Probabilidade de significância
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T	Tratados
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC	Unidades formadoras de colônia
YSI	Incorporated yellow springs

LISTA DE SIMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μ	Micras
$>$	Maior
\pm	Maior ou menor
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$<$	Menor
$\%$	Porcentagem
ρ^2	Coeficiente de correlação de Spearman

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Valores médios (n=8) e análise de variância ¹ dos resultados observados no estudo leucocitário de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	20
Figura 2: Valores médios (n=8) e análise de variância ¹ dos resultados observados da contagem de trombócitos de Tilápias Vacinadas e Desafiadas com <i>Streptococcus agalactiae</i> , tratadas com Tilosina.....	22
Figura 3: Valores médios (n=8) observados na atividade respiratória de leucócitos (Burst oxidativo respiratório) de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	25
Figura 4: Valores médios (n=8) observados na concentração de lisozima de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	26
Figura 5: Valores médios (n=8) e análise de variância ¹ dos resultados observados na relação entre a concentração de proteínas totais e albumina (globulinas) de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	29
Figura 6: Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	34
Figura 7: Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	35
Figura 8: Fotomicrografia de corte histológico de coração de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	36
Figura 9: Fotomicrografia de corte histológico de cérebro (teto óptico) de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	36
Figura 10: Fotomicrografia de corte histológico de rim caudal de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	37
Figura 11: Fotomicrografia de corte histológico de porção proximal do estômago de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	38
Figura 12: Fotomicrografia de corte histológico de porção proximal do estômago de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos grupos de Tilápias nos diferentes tratamentos para estudo de inflamação aguda.	8
Tabela 2: Valores médios (n=8) e análise de variância ¹ dos resultados observados na avaliação do acúmulo celular na aerocistite de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	17
Tabela 3: Valores médios (n=8) e análise de variância ¹ dos resultados observados no estudo hematológico de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	19
Tabela 4: Valores médios (n=8) e análise de variância ¹ dos resultados observados no estudo diferencial leucocitário de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	21
Tabela 5: Análise de correlação entre os valores de atividade respiratória ou lisozima sérica ao número absoluto de neutrófilos e monócitos contados no sangue de tilápias submetidas aos diferentes tratamentos durante aerocistite infecciosa por <i>Streptococcus agalactiae</i>	27
Tabela 6: Valores médios (n=8) e análise de variância ¹ dos resultados observados na concentração de proteína total e albumina de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	28
Tabela 7: Valores médios (n=8) e análise de variância ¹ dos resultados observados na concentração de proteínas de fase aguda de tilápias, <i>O. niloticus</i> , submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por <i>S. agalactiae</i>	30
Tabela 8: Análise de correlação entre os valores de avaliação somática de tilápias submetidas aos diferentes tratamentos durante aerocistite infecciosa por <i>Streptococcus agalactiae</i>	31

1. INTRODUÇÃO

O setor de pescado no Brasil apresentou um crescimento de 31,2% na produção anual entre os anos 2008 e 2010, atingindo quase 500 mil toneladas/ano (FLORES e FILHO, 2013). A criação de algumas espécies de peixes vem crescendo significativamente nos últimos anos, dentre estas, destacam-se as tilápias, pois apresentam elevada precocidade e rusticidade, além também da sua carne ser altamente apreciada pelo consumidor (CASTRO et al., 2014a).

A biomanipulação dos ecossistemas aquáticos com a maximização dos recursos produtivos traz consigo inúmeros desafios, dentre os quais se destaca o controle sanitário das populações de peixes. Em geral, o aumento de espécimes por área, somado às práticas de manejo, resulta na ocorrência do estresse, condição fisiológica responsável por imunossuprimir os sistemas de defesa dos peixes, predispondo-os as mais diversas enfermidades (BELO et al., 2005; REQUE et al., 2010; BELO et al., 2012a; CLAUDIANO et al., 2013).

Agentes etiológicos que causam aparentemente poucos danos às populações de peixes em seu habitat natural podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (TORT, 2011).

O *Streptococcus agalactiae* representa um importante patógeno para a tilapicultura intensiva brasileira, sendo responsável por significativas perdas econômicas e inúmeras estratégias vêm sendo estudadas para controlar surtos desta doença nos plantéis piscícolas (SALVADOR et al., 2012; CASTRO et al., 2014b). Por outro lado, estudos buscam compreender e avaliar alterações fisiopatológicas na evolução destas enfermidades, nas quais a análise hematológica e bioquímica sérica fornecem subsídios importantes no diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações animais (BELO et al., 2013; 2014).

Compostos terapêuticos que apresentam tanto ação antibacteriana, bem como efeitos moduladores em mecanismos de defesa, são promissores para o tratamento de doenças causadas por bactérias nos peixes. Ao longo das últimas

duas décadas, tem havido um interesse crescente nos potenciais efeitos moduladores do sistema imunológico dos antimicrobianos do grupo dos macrolídeos como a tilosina (GOOD et al., 2012), porém são escassas as informações do uso deste fármaco no controle de enfermidades bacterianas nos peixes.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Partindo-se da importância patogênica da streptococcose para tilapicultura intensiva e da importância da reação inflamatória na resposta de defesa dos peixes teleósteos, este estudo tem por objetivo avaliar a atividade imunomodulatória do macrolídeo tilosina sobre a reação inflamatória aguda de tilápias, *O. niloticus*, vacinadas e desafiadas com *S. agalactiae*.

2.2 Especifico

- Avaliar a atividade imunomodulatória do macrolídeo tilosina sobre o acúmulo celular no foco inflamado na aerocistite infecciosa de tilápias (*O. niloticus*) vacinadas e desafiadas com *S. agalactiae*.
- Avaliar a atividade imunomodulatória do macrolídeo tilosina sobre o Hemograma, leucograma e trombograma de tilápias (*O. niloticus*) vacinadas e desafiadas com *S. agalactiae*.
- Avaliar a atividade imunomodulatória do macrolídeo tilosina sobre a resposta bioquímica sérica de tilápias (*O. niloticus*) vacinadas e desafiadas com *S. agalactiae*.
- Avaliar a atividade imunomodulatória do macrolídeo tilosina sobre a atividade respiratória dos leucócitos e de lisozima sérica de tilápias (*O. niloticus*) vacinadas e desafiadas com *S. agalactiae*.

- Avaliar a atividade imunomodulatória do macrolídeo tilosina sobre o proteinograma de tilápias (*O. niloticus*) vacinadas e desafiadas com *S. agalactiae*.
- Avaliar a atividade imunomodulatória do macrolídeo tilosina sobre os índices somáticos dos órgãos de tilápias (*O. niloticus*) vacinadas e desafiadas com *S. agalactiae*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Inflamação em Teleósteos

Segundo Contran et al. (2004) as infecções bacterianas são agressões biológicas ao organismo dos peixes que respondem através do processo inflamatório na tentativa de diluir, circunscrever e isolar ou destruir o agente agressor. Uma das suas principais características é a mobilização adequada e em tempo hábil, de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado onde se acumulam (MORAES; MORAES, 2009). Nos mamíferos inflamação aguda tem duração relativamente curta, perdurando por minutos, horas, por um ou dois dias, e se caracteriza por vasodilatação arteriolar, capilar e venular, aumento de permeabilidade vascular e instituição de edema; aumento da viscosidade sanguínea e marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes (MORAES; MORAES, 2009), podendo sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal, da intensidade da agressão e do nível de especificidade da resposta. Outros mecanismos de defesa envolvem a produção de peptídeos para controle microbiano, atividade de lisozima, sistema complemento e outras proteínas sanguíneas (COLONNA et al., 2006).

Por inoculação de carragenina na bexiga natatória de *O. niloticus* e *Piaractus mesopotamicus* houve uma resposta inflamatória caracterizada por congestão vascular, acúmulo de células mononucleares e raros granulócitos (MATUSHIMA; MARIANO, 1996; MARTINS et al., 2006). A inoculação de *Aeromonas hydrophila* inativada, tioglicolato e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* na bexiga natatória de *P. mesopotamicus*, demonstrou após 24 horas maior acúmulo de exsudato com presença marcante de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos que variaram de acordo com o tipo de estímulo inflamatório (BOZZO et al., 2007).

No entanto, Endo (1997) com a injeção de LPS na bexiga natatória de *O. niloticus* houve a formação de exsudato constituído principalmente por neutrófilos (96%) 24 horas depois da aplicação, o mesmo acúmulo de granulócitos foi encontrado por Moraes et al. (2011) em estímulo por *Aeromonas hydrophilana* mesma espécie.

O pico de produção das proteínas de fase aguda geralmente ocorre entre 12 e 24 horas após o início da resposta inflamatória aguda. A eletroforese permite uma avaliação aproximada das concentrações de várias proteínas importantes, cujas alterações estruturais, seja de regulação de suas sínteses, ou de seu maior consumo, podem refletir nas suas modalidades eletroforéticas ou nas suas concentrações (FELDMAN, 2000).

3.2. Tilapicultura intensiva no Brasil

O crescente aumento na comercialização mundial das tilápias, espécies de teleósteos dos gêneros *Oreochromis* e *Tilapia*, especialmente pelo aumento da produção na China e outros países em desenvolvimento, como o Brasil, transformou este grupo de peixes no segundo mais importante para a aquicultura e o terceiro mais importado pelos EUA e Europa, depois somente dos camarões marinhos e salmões (CONRAY; CONRAY, 2004). Tal fato é resultante do potencial fisiológico reprodutivo e de adaptação destes animais, que apresentam elevada rusticidade,

fácil domesticação e excelente valor agregado para a comercialização, gerando perspectivas de se tornarem o mais importante grupo de espécies aquícolas neste século XXI (FITZSIMMONS, 2000).

De acordo com as estatísticas do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a produção de tilápias representou cerca de 38% da produção de pescado continental no Brasil no ano de 2010, sendo este ciclídeo o grupo de peixes mais criado. Neste contexto, destaca-se a espécie *Oreochromis niloticus*, comumente chamada de “tilápia nilótica”, de origem africana, oriunda da bacia do Rio Nilo, pertencente à família Cichlidae. Para Zimmermann e Fitzsimmons (2004), no Brasil, a tilapicultura segue a mesma tendência mundial, com predomínio de tilápias nilóticas ao invés de tilápias vermelhas, pois estas apresentam crescimento mais rápido e um rendimento de filé superior quando comparadas às demais espécies de tilápias.

Por outro lado, as disputas por novos mercados, a concorrência com outros países neste início das exportações, a necessidade de se desenvolver um mercado interno mais forte, bem como as novas oportunidades de uma aquicultura intensiva, deverão considerar os aspectos sanitários na produção das tilápias, através de manejos eficientes do sistema aquático que visem melhorar não somente a produtividade, mas também proteger o consumidor e o meio ambiente (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004).

3.3 *Streptococcus agalactiae*

Dentre as enfermidades de etiologia bacteriana em sistemas de criação intensiva de tilápia, destaca-se a septicemia por *Streptococcus* spp. (SURESH, 1998). O *Streptococcus agalactiae* é classificado como do grupo B Lancefield apresentando células esféricas ou cubóides. Esta bactéria é Gram-positiva, catalase negativa, unem-se em forma de pares ou cadeias, é imóvel, não esporulada e anaeróbia facultativa. Obtém energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose (HARDIE; WHILEY, 1997). Seu papel mais importante está na capacidade

de seus polissacarídeos inibirem a fagocitose por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro (NIZET, 2002), sendo bactérias oportunistas amplamente distribuídas no ambiente aquático associadas à má qualidade da água, manejo inadequado e condições de criação intensiva, causando prejuízos importantes para a aquicultura mundial (BUNCH; BEJERANO, 1997).

Nos peixes, o quadro clínico principal é a meningoencefalite acompanhada de anorexia, natação errática com movimentos giratórios na superfície da água e escurecimento da pele. Macroscopicamente encontram-se hemorragias cutâneas difusas em todo o corpo, na região cefálica e caudal, além de esplenomegalia, ascite e septicemia (SHOEMAKER; KLESIUS, 1997).

3.4. Antibióticos Macrolídeos e a Tilosina

Os macrolídeos reúnem um grupo de fármacos muito utilizados no tratamento de diversas doenças infecciosas. Esses fármacos atuam inibindo a síntese proteica e o crescimento bacteriano, fazendo com que proteínas vitais deixem de ser sintetizadas e causando a morte do patógeno. Alguns estudos apontaram que, independente de sua atividade antimicrobiana, os macrolídeos apresentam propriedades anti-inflamatórias e antivirais (BEIGELMAN et al., 2009).

A origem da descoberta do mecanismo anti-inflamatório dos macrolídeos ocorreu na década de 1980 no Japão, quando o uso desse medicamento aumentou significativamente a sobrevivência de pacientes com panbronquiolite difusa (PBD), uma grave doença pulmonar crônica, com intensa inflamação neutrofílica (JAFFÉ; BUSH, 2001). Dentre seus efeitos mais relevantes estão a inibição da síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias, assim como efeitos na atividade dos neutrófilos através da inibição da sua migração para os sítios de inflamação. Os macrolídeos também podem inibir a degranulação dos leucócitos, reduzir a inflamação eosinofílica, ativar a fagocitose dos macrófagos e ainda aumentar o transporte mucociliar, diminuindo a produção de muco *in vivo* e *in vitro*. Esses fármacos apresentaram efeito na imunidade adaptativa através da regulação de células T e da apresentação de antígenos (GOOD et al., 2012).

O Tilmicosin é um antibiótico macrolídeo semissintético, derivado da tilosina, provou ser eficaz no tratamento de doenças inflamatórias das vias aéreas de gado bovino segundo Fodor et al. (2000) e Picavet et al. (1991), em ovelhas (NACCARI et al., 2001), suína (MOORE et al., 1996) e as e mastite em animais ruminantes (NACCARI et al., 2003). Segundo Scoreneaux e Shryock (1999), a eficácia da tilmicosin é atribuída ao seu caráter farmacodinâmico e baixas concentrações inibitórias. Há evidências para sugerir que tilmicosin exerce ações imunomoduladoras sobre apoptose de neutrófilos (LEE et al, 2004) e da produção modulada de fatores inflamatórios, incluindo prostaglandina E2 (PGE 2) em macrófagos (LAKRITZ et al., 2002). Outros investigadores também descobriram que os macrolídeos utilizados em humanos inibiu a indução de (NO) por macrófagos alveolares iNOS mRNA e óxido nítrico, bem como a expressão de iNOS e COX-2 de proteínas em macrófagos, e diminuição da produção de citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-8 e um aumento da produção de IL-10 em monócitos humanos (KOHRI et al., 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Peixes e acondicionamento

Para o estudo foram utilizadas 104 tilápias do Nilo (\pm 400 g) oriundas da mesma desova, acondicionadas em 13 tanques (n=8), com capacidade de 500L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano, com vazão de 1 L/min. Após o transporte para os aquários, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L (CARNEIRO; URBINATI, 2001).

Durante o experimento os peixes foram alimentados com ração comercial peletizada (32% de proteína bruta), constituindo a dieta basal. O arraçoamento dos animais foi feito duas vezes ao dia, alimentados pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa dos aquários. A qualidade da água determinada nos momentos da alimentação, sendo a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido medidos pelo aparelho YSI, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pelo aparelho YSI, modelo 63. Durante todo o experimento as variáveis físico-químicas (temperatura= $30,5 \pm 1,0$ °C, oxigênio dissolvido = $4,1 \pm 1,0$ mg / L, pH = $8,20 \pm 0,3$ e condutividade = $204,5 \pm 20,1$ mS /cm) mantiveram-se em zona de conforto para a espécie (BOYD, 1990).

4.2 Delineamento experimental

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 13 tanques, constituindo os seguintes tratamentos (Tabela 1): PF= Padrão Fisiológico (n=8); NT+V= Não tratados com tilosina e vacinados (n=24); NT+NV= Não tratados com tilosina e não vacinados (n=24); T+V= Tratados com tilosina e vacinados (n=24); T+NV= Tratados com tilosina e não vacinados (n=24). Sendo amostrados em três períodos, isto é: seis, 24 e 48 horas pós-desafio (HPD), para a avaliação da resposta no tempo.

Tabela 1: Distribuição dos grupos de Tilápias nos diferentes tratamentos.

GRUPOS	TRATAMENTOS	HPD (Horas pós-desafio ¹)		
		6	24	48
PF ²	Padrão Fisiológico		n=8	
NT+V	Não tratados com tilosina ³ e vacinados	n=8	n=8	n=8
NT+NV	Não tratados com tilosina ³ e não vacinados	n=8	n=8	n=8
T+V	Tratados com tilosina ³ e vacinados	n=8	n=8	n=8
T+NV	Tratados com tilosina ³ e não vacinados	n=8	n=8	n=8

¹ Desafio com *S. agalactiae* em bexiga natatória.

² Grupo padrão fisiológico para obtenção de valores de referência de peixes não vacinado e não tratado, sem desafio bacteriano.

³ Tartarato de Acetilisovaleriltilosina, Aivlosin FG50[®], Sanphar.

4.3 Dietas experimentais contendo tilosina

A composição da dieta basal seguiu às exigências para tilápias, estabelecidas no NRC, através da utilização de ração comercial peletizada LAGUNA-Socil® (28% de proteína bruta e 4000 kcal de energia bruta kg⁻¹). Para padronização da dieta experimental contendo o macrolídeo tilosina, a ração comercial foi finamente triturada para ser misturada na proporção de 400mg/Kg de tartarato de acetil isovaleril tilosina (Aivlosin®, Sanphar), respectivamente, conforme recomendação do fabricante do fármaco. A mistura contendo o macrolídeo foi novamente peletizada e estocada em saco plástico escuro, a - 16°C até o uso.

4.4 Anestesia dos peixes

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para sedação e captura dos animais no momento do desafio bacteriano e 1:500 no momento da eutanásia. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (WEDEMEYER, 1970). Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados nos aquários com fluxo de água contínuo e aeração.

4.5 Produção e administração da vacina contra *Streptococcus agalactiae*

A suspensão bacteriana utilizada como vacina foi produzida pelo cultivo de alíquota do isolado de *S. agalactiae* conforme metodologia de Pilarski et al. (2008). Brevemente, à suspensão antigênica foi adicionado o adjuvante incompleto de

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

A vacina foi administrada via intramuscular na região dorso-lateral esquerda na dose de 0,5 mL. Realizou-se uma estimulação vacinal 15 dias antes do desafio bacteriano nas duas repetições dos grupos T+V e NT+V. Enquanto, os peixes dos grupos T+NV e NT+NV foram submetidos à administração de solução fisiológica + adjuvante incompleto de Freund (na proporção de 1:1) na mesma dose, para padronização do estresse de captura e manejo.

4.6 Desafio bacteriano

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

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

4.7 Aerocistite infecciosa

Para a avaliação do acúmulo de células totais, ao término dos tempos pré-estabelecidos de seis, 24 e 48 HPD, os animais foram dissecados dando acesso à bexiga natatória. A seguir, esta foi lavada cuidadosamente com 1 mL de solução

gelada de PBS contendo EDTA a 0,09%. O mesmo volume injetado foi coletado com auxílio de micropipeta monocanal, e transferido para tubos tipo eppendorf mantidos no gelo. A solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada a 1000 rpm, por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento total foi ressuspenso com a adição de 100 µL do sobrenadante previamente retirado e uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz, coradas pelo método Tavares-dias e Moraes (2003).

Para a contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos foi colocada uma gota deste exsudato sobre lâmina histológica, juntamente com uma gota de soro de tilápia, extraída no dia anterior e mantidos sob refrigeração. Após homogeneização, foi feita a extensão, deixou-se secar em temperatura ambiente para posterior fixação em álcool metílico. Depois de secas, foram coradas pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz de até 200 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório.

4.8 Hematologia

Para avaliação do hemograma foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis previamente heparinizadas, às 6, 24 e 48 horas após estímulo bacteriano. A partir das amostras de sangue total foi feita a contagem direta de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Natt e Herrick (1952) como diluente na proporção de 1:100 (v:v). Os eritrócitos foram quantificados nos cinco quadrantes secundários em diagonal do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 5000. Em relação à determinação total de leucócitos e trombócitos foram quantificados todos juntos nos 25 quadrantes secundários do quadrado

central, sendo este valor multiplicado por 1000. Para determinação da proporção de trombócitos e leucócitos no sangue foram realizadas extensões sanguíneas em lâmina. Depois de secas, foram coradas com corante “May-Grunwald-Giemsa-Wright” segundo Tavares-dias e Moraes (2003). Assim, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse.

4.9 Avaliação do bioquímico sérico

A glicemia dos animais foi determinada utilizando o aparelho Accu-Chek Performa, e alíquotas de soro foram destinadas a avaliação da atividade hepática de fosfatase alcalina, glicose, colesterol, triglicerídeos, através da determinação enzimática e colorimétrica em analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest – Bioplus[®]).

4.10 Análise da atividade respiratória dos leucócitos e de lisozima sérica

Realizou-se análise da atividade respiratória dos leucócitos seguindo a técnica descrita por Biller-Takahashi et al. (2013). Brevemente, coletaram-se 2 mL de sangue periférico com heparina de cada peixe/tratamento/tempo, deste utilizaram-se 100 µL para leitura do burst, aos 100 µL de sangue foi acrescentado 100 µL de NBT (0,2% w/v PBS – Sigma[®]). Esta mistura foi incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) no escuro. Seguidamente as amostras foram agitadas em vortex e retirado 50 µL de cada amostra e transferidas para outro tubo tipo Eppendorf, em seguida foi acrescentado 1 mL de N, N-dimetil formamida - DMF (Sigma[®]) homogeneizado e centrifugado a 3000 G durante 5 min. Posteriormente foi realizada a leitura do sobrenadante em 540 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-22) previa calibragem com o branco. Para o branco utilizaram-se todos os passos excluindo o sangue, sendo substituído por 100 µL de água destilada.

Para a análise de lisozima sérica Uma alíquota de sangue sem anticoagulante foi deixado em repouso por duas horas em temperatura ambiente e centrifugado a 3000 rpm por cinco minutos, a 10°C, para extração de soro que foi armazenado a -20°C até determinação da concentração da lisozima. A análise foi realizada segundo Ellis (1990) e adaptado por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreu et al. (2009). A curva padrão foi estabelecida com seis concentrações de lisozima (50, 80, 100, 150, 200 e 300 ng em 300 µL de tampão fosfato de sódio – NaH₂PO₄; 0,05 M; pH 7,4). Um volume de 300 µL de cada concentração foi pipetado em uma cubeta de 1 mL seguido da adição de 300 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10 mg de bactéria em 50mL de tampão fosfato de sódio). A densidade óptica (DO) foi medida imediatamente por espectrofotometria cinética, durante 10 minutos, com leituras realizadas a cada 20 segundos em comprimento de onda de 450 nm. A diferença entre a DO inicial e final (ΔDO) de cada concentração foi calculada em 5 minutos de leitura e a curva representada graficamente. As amostras de soro mantidas a -20 °C foram submetidas a tratamento térmico de 56 °C por 30 minutos, para inativação das proteínas do sistema complemento e garantia de que a lise foi provocada pela lisozima. O mesmo procedimento que determinou a curva padrão foi realizado com as amostras, utilizando-se volumes de 100 µL de soro e 150 µL de tampão fosfato de sódio. A concentração da lisozima de cada amostra foi quantificada pela curva padrão determinada, utilizando-se a equação da reta e as respectivas ΔDO s (WON et al., 2004).

4.12 Proteinograma

Alíquotas de soro foram destinadas a avaliação de proteínas totais e albumina através da determinação enzimática e colorimétrica em analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest – Bioplus®). As concentrações de globulinas totais foram determinadas pela subtração das albuminas totais em relação às proteínas totais plasmáticas, tendo como resultado a expressão dos valores das globulinas totais.

Para a análise das proteínas de fase aguda o fracionamento eletroforético foi realizado em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi realizado por técnica descrita por Laemmli (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI-VERTICALELEKTROPHORESIS CELLS®- BIO-RAD) com amostra de soro. Para polimerização do gel foi necessário à adição de 15,0 µL de tetrametiletilenodiamina e 0,3 µL de persulfato de amônia a 10%. A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 36,30g de tris-base, 112,50g de glicina, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. A parte superior da placa que contém o gel entrara em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,5 constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10g de SDS, em um litro de água destilada estéril. As placas foi preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%.

As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10 µL de soro sanguíneo diluídos em 30 µL de tampão-fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL das referidas amostras foi depositada no fosso do gel. A placa foi colocada em suporte apropriado, em contato com solução tampão com pH 8,5 e submetida à corrente elétrica a 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel foi corado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uma coloração uniforme e, em seguida, retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foi determinados por densitometria computadorizada (SHIMADZU CS-930) através do escaneamento das amostras.

4.13 Avaliação somática dos órgãos

Após a necropsia, fígado, rim caudal, e baço foram coletados para avaliação morfométrica realizada de acordo com Weibel et al. (1969), através da proporção entre peso do órgão (PO) e peso corporal (PC) expressos como índice somático hepático, renal, e esplênico calculado pela fórmula: Índice somático (IS) = $PO \times 100/PC$.

4.14 Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância através de delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com parcela subdividida no tempo “Split Plot Design” (2 tratamentos com o macrolídeo X 2 vacinação X 3 tempos), utilizando-se o pacote estatístico SAS, pelo procedimento PROC GLM, versão 8.2 (SAS, 2001). As comparações múltiplas foram aferidas pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança de acordo com Snedecor e Cochran (1974).

5. RESULTADOS

5.1 Aerocistite infecciosa

O estudo da aerocistite (Tabela 2) demonstrou um aumento no número de migração celular conforme o passar do tempo ($P < 0.001$), tendo o pico deste acúmulo em 48 HPD. Peixes vacinados mostraram incremento altamente significativo, principalmente na fase mais aguda e em 48 HPD. O tratamento com tilosina (T+NV) não demonstrou alterações estatística quando comparados aos outros grupos.

De um modo geral, em relação ao estímulo da reação inflamatória observou-se maior acúmulo de células granulocíticas no exsudato em comparação com outros tipos celulares. O tratamento com tilosina quando não associado a vacina teve aumento no percentual relativo de granulócitos conforme o passar do tempo, sendo o pico em 48 horas, diferentemente, quando associado o tratamento com a vacinação, observa-se este pico em 24HPD. Os valores absolutos destas células teve diferença estatística em animais vacinados (NT+V e T+V) principalmente em 48HPD.

Os valores relativos de linfócitos sofreram uma redução conforme o passar do tempo experimental ($P < 0.001$), sendo o pico de percentual celular agudo em 6 HPD, com exceção de animais do controle positivo (NT+NV) que apresentaram o pico em 24 HPD. Em 6HPD animais T+NV tiveram maior número de linfócitos quando comparados aos outros grupos, seguido por animais vacinados (NT+V e T+V), ambos demonstraram maiores valores que o grupo NT+NV. Diferentemente em 48 HPD animais V+NT obtiveram maior presença desta célula no exsudato, enquanto T+NV apresentaram menor valor.

Analisando a evolução da reação inflamatória em relação a macrófagos, de um modo geral o acúmulo ocorreu tardiamente no tempo de 48 HPD. No período de 24 HPD o grupo NT+NV obteve maior acúmulo de macrófagos quando comparados a animais tratados e vacinados.

Tabela 2: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados na avaliação do acúmulo celular na aerocistite de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

Tempo ²	Tratamento ²	Vacinação ²	Células Totais		Linfócito		Macrófagos		Granulócitos		Trombócito	
			(x10 ³ /μL)	R (%) ⁴	A (x10 ³ /μL) ⁴	R (%)	A (x10 ³ /μL)	R (%)	A (x10 ³ /μL)	R (%)	A (x10 ³ /μL)	
6	NT	V	230 ^{Aa}	15.50 ^{ABa}	35 ^{Ab}	3.75 ^{Ab}	9 ^{Ab}	78.75 ^{Ba}	181 ^{Ab}	2.00 ^{Ba}	4 ^{Ab}	
	NT	NV	192 ^{Ac}	5.00 ^{Cab}	9 ^{Aa}	2.75 ^{Ab}	4 ^{Aa}	91.62 ^{Aa}	176 ^{Ab}	0.63 ^{Ba}	1 ^{Aa}	
	T	V	286 ^{Ac}	12.12 ^{BCa}	39 ^{Ab}	5.12 ^{Ab}	15 ^{Ab}	80.75 ^{ABa}	226 ^{Ab}	2.00 ^{Ba}	6 ^{Aa}	
	T	NV	251 ^{Ac}	21.25 ^{Aa}	54 ^{Aa}	7.12 ^{Aa}	16 ^{Ab}	67.25 ^{Cb}	169 ^{Ab}	4.38 ^{Aa}	10 ^{Aa}	
24	NT	V	3292 ^{ABb}	8.12 ^{Ab}	247 ^{Ab}	6.25 ^{Aab}	216 ^{Ab}	84.62 ^{Aa}	2782 ^{Ab}	1.00 ^{Aa}	45 ^{Ab}	
	NT	NV	3832 ^{Ab}	9.75 ^{Aa}	404 ^{Aa}	8.50 ^{Aa}	345 ^{Aa}	81.12 ^{Aa}	3053 ^{Ab}	0.63 ^{Aa}	29 ^{Aa}	
	T	V	3729 ^{ABb}	8.25 ^{Aab}	220 ^{Ab}	6.12 ^{Aab}	132 ^{Ab}	84.62 ^{Aa}	3331 ^{Ab}	1.00 ^{Aa}	44 ^{Aa}	
	T	NV	2389 ^{Bb}	8.75 ^{Ab}	218 ^{Aa}	7.37 ^{Aa}	162 ^{Aab}	82.62 ^{Aa}	1976 ^{Ab}	1.25 ^{Ab}	31 ^{Aa}	
48	NT	V	50156 ^{Aa}	5.25 ^{Ab}	2608 ^{Aa}	10.75 ^{Aa}	5391 ^{Aa}	83.37 ^{Aa}	41815 ^{Aa}	0.63 ^{Aa}	315 ^{Aa}	
	NT	NV	17312 ^{Ca}	2.37 ^{Ab}	522 ^{Ba}	7.75 ^{Aab}	1544 ^{Ca}	88.25 ^{Aa}	15006 ^{Ca}	1.63 ^{Aa}	239 ^{Aa}	
	T	V	36750 ^{Ba}	4.62 ^{Ab}	1894 ^{Ba}	11.37 ^{Aa}	4520 ^{Ba}	82.75 ^{Aa}	29911 ^{Ba}	1.25 ^{Aa}	422 ^{Aa}	
	T	NV	17606 ^{Ca}	3.12 ^{Ab}	571 ^{Ba}	10.25 ^{Aa}	2133 ^{Ca}	85.12 ^{Aa}	14726 ^{Ca}	1.5 ^{Ab}	174 ^{Aa}	
Tempo ³			615.86 ^{**}	13.08 ^{**}	0.68 ^{NS}	7.43 [*]	32.21 ^{**}	1.78 ^{NS}	598.21 ^{**}	4.99 [*]	1.63 ^{NS}	
Tratamento ³			1.16 ^{NS}	1.73 ^{NS}	0.00 ^{NS}	1.26 ^{NS}	0.06 ^{NS}	3.08 ^{NS}	2.23 ^{NS}	5.45 [*]	4.55 [*]	
Vacinação ³			18.12 ^{**}	0.15 ^{NS}	1.91 ^{NS}	0.00 ^{NS}	0.12 ^{NS}	0.01 ^{NS}	17.36 ^{**}	1.03 ^{NS}	3.37 ^{NS}	
Tempo*Tratamento ³			3.15 [*]	2.07 ^{NS}	1.16 ^{NS}	0.81 ^{NS}	1.80 ^{NS}	2.40 ^{NS}	2.15 ^{NS}	2.33 ^{NS}	0.13 ^{NS}	
Tempo*Vacinação ³			13.77 ^{**}	0.37 ^{NS}	0.99 ^{NS}	0.98 ^{NS}	5.71 [*]	0.63 ^{NS}	11.34 ^{**}	0.37 ^{NS}	0.93 ^{NS}	
Tratamento*Vacinação ³			0.13 ^{NS}	4.65 [*]	0.00 ^{NS}	0.32 ^{NS}	0.64 ^{NS}	3.81 [*]	0.04 ^{NS}	3.01 ^{NS}	0.30 ^{NS}	
Tempo*Vacinação*Tratamento ³			7.22 [*]	4.53 [*]	0.36 ^{NS}	0.28 ^{NS}	0.36 ^{NS}	3.46 [*]	6.72 [*]	3.66 [*]	1.94 ^{NS}	
Coeficiente de variação			3.76	86.75	42.4	76.52	24.66	13.87	3.93	114.50	93.61	

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

² Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; 0 e 1,5 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração.

³ Significância estatística: NS- não significativo para P>0,05; * - Significativo para P<0,05; ** - Significativo para P<0,01

⁴ R: Valor relativo, A: Valor absoluto (x10³/μL)

5.2 Hematologia

5.2.1 Série vermelha

O estudo hematológico das tilápias durante aerocistite infecciosa por *S. agalactae* revelou alterações microcíticas e hipercrômicas na fase inicial da resposta de defesa 6 HPD, marcado pela diminuição dos valores de hematócrito e do volume corpuscular médio (VCM), assim como, pelo aumento da hemoglobina e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) quando comparados aos valores de referência observados nos animais controles (padrão fisiológico).

Na comparação entre os tratamentos, verificou-se efeitos mais deletérios em peixes tratados com tilosina e não vacinados (T+NV) com aumento significativo ($P < 0,05$) do CHCM e diminuição dos valores percentuais de hematócrito quando comparados aos animais não tratados e não vacinados (NT+NV), demonstrando a participação benéfica da estimulação vacinal que amenizou parcialmente tais efeitos.

Com a evolução do processo inflamatório 24 HPD, a participação benéfica da imunização dos peixes e o efeito negativo do tratamento com tilosina sobre a resposta hematológica ficaram mais evidentes. Nesta fase, os peixes apresentaram diminuição do número de hemácias e aumento do VCM quando comparadas aos peixes controles (padrão fisiológico), exceto tilápias vacinadas e não tratadas com tilosina. Peixes tratados com tilosina e vacinados apresentaram diminuição significativa ($P < 0,05$) no número de eritrócitos e aumento significativo ($P < 0,05$) do VCM.

A diminuição no número de eritrócitos se manteve com 48 HPD e apesar de não existir diferença entre os tratamentos, peixes somente vacinados (NT+V) não apresentaram variação significativa ($P > 0,05$) entre os três períodos observados, confirmando a hipótese de que a estimulação vacinal amenizou os efeitos deletérios da aerocistite infecciosa por *S. agalactae*. Inclusive tilápias tratadas com tilosina e não vacinadas (T+NV) apresentaram alterações mais severas no quadro

hematológico (48 HPD) com menor valor médio na contagem de eritrócitos, associado a diminuição significativa ($P < 0,05$) do hematócrito e na quantidade de hemoglobina

Tabela 3: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados no estudo hematológico de tilápias (*O. niloticus*) submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

Tempo ²	Tratamento ²	Vacinação ²	Hemácia ³	Hematócrito ³	Hemoglobina ³	VCM ³	CHCM ³
Padrão fisiológico ³			1.61 ± 0.17	46.00 ± 2.67	10.24 ± 0.37	290.48 ± 36.46	22.24 ± 1.21
6	NT	V	1.57 ^{Aa}	40.87 ^{ABa}	12.08 ^{Aa}	262 ^{Aa}	29 ^{ABa}
	NT	NV	1.61 ^{Aa}	41.25 ^{Aa}	11.03 ^{Ba}	257 ^{Aa}	26 ^{Ba}
	T	V	1.63 ^{Aa}	36.87 ^{ABa}	11.98 ^{ABa}	226 ^{Ab}	33 ^{Aa}
	T	NV	1.41 ^{Aa}	35.62 ^{Bb}	11.55 ^{ABa}	254 ^{Ab}	34 ^{Aa}
24	NT	V	1.58 ^{Aa}	39.62 ^{Aa}	8.72 ^{ABb}	260 ^{Ba}	21 ^{Ab}
	NT	NV	1.37 ^{ABb}	39.00 ^{Aa}	7.85 ^{Bb}	300 ^{ABa}	20 ^{Ab}
	T	V	1.31 ^{Bb}	42.25 ^{Aa}	8.97 ^{Ab}	327 ^{Aa}	21 ^{Ab}
	T	NV	1.35 ^{ABa}	42.42 ^{Aa}	8.33 ^{ABb}	311 ^{ABa}	20 ^{Ab}
48	NT	V	1.49 ^{Aa}	38.50 ^{ABa}	8.96 ^{Ab}	262 ^{Aa}	23 ^{Ab}
	NT	NV	1.38 ^{Ab}	39.25 ^{Aa}	7.46 ^{Bb}	292 ^{Aa}	19 ^{Ab}
	T	V	1.42 ^{Ab}	39.87 ^{Aa}	9.02 ^{Ab}	280 ^{Aa}	23 ^{Ab}
	T	NV	1.26 ^{Aa}	33.28 ^{Bb}	6.70 ^{Bc}	266 ^{Ab}	21 ^{Ab}
Tempo ⁴			5.02 ^{**}	2.31 ^{NS}	107.86 ^{**}	6.91 [*]	39.27 ^{**}
Tratamento ⁴			4.46 [*]	1.28 ^{NS}	0.10 ^{NS}	0.22 ^{NS}	3.84 [*]
Vacinação ⁴			4.28 [*]	0.99 ^{NS}	26.59 ^{**}	0.97 ^{NS}	3.29 ^{NS}
Tempo*Tratamento ⁴			0.21 ^{NS}	3.70 [*]	0.92 ^{NS}	2.51 ^{NS}	2.78 ^{NS}
Tempo*Vacinação ⁴			0.14 ^{NS}	0.51 ^{NS}	2.99 [*]	0.02 ^{NS}	0.39 ^{NS}
Tratamento*Vacinação ⁴			0.05 ^{NS}	1.28 ^{NS}	0.00 ^{NS}	1.08 ^{NS}	1.52 ^{NS}
Tempo*Vacinação*Tratamento ⁴			2.32 ^{NS}	1.00 ^{NS}	0.93 ^{NS}	1.60 ^{NS}	0.31 ^{NS}
Coeficiente de variação			16.15	14.88	11.38	19.31	20.32

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

² T=tempo, TTr= Tratamento, VAC= vacinação. Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; 0 e 1,5 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

³ Hemácia = $\times 10^6/\mu\text{L}$, Hematócrito= %, Hemoglobina= g/dL, VCM (volume corpuscular médio)= fL, e CHCM (concentração hemoglobina corpuscular média)= g/dL.

⁴ Valor determinado (n=8) de tilápias sem nenhum estímulo, e mantidos nas mesmas condições experimentais (nutrição e ambiência)

⁵ Significância estatística: NS- não significativo para $P > 0,05$; * - Significativo para $P < 0,05$; ** - Significativo para $P < 0,01$

5.1.2 Leucograma

A associação da vacina coma tilosina fez com que o grupo V+T que inicialmente (6HPD) teve leucocitose com marcada linfocitose absoluta, monocitose relativa e neutrofilia relativa e absoluta. Após, teve uma queda demonstrando leucopenia (24 HPD) com neutrofilia e monocitose, ambas relativas e absolutas. Em 48 HPD esta associação conseguiu recuperar os valores leucocitários próximo ao grupo PF, mas ainda com monocitose e neutrofilia relativa e absoluta.

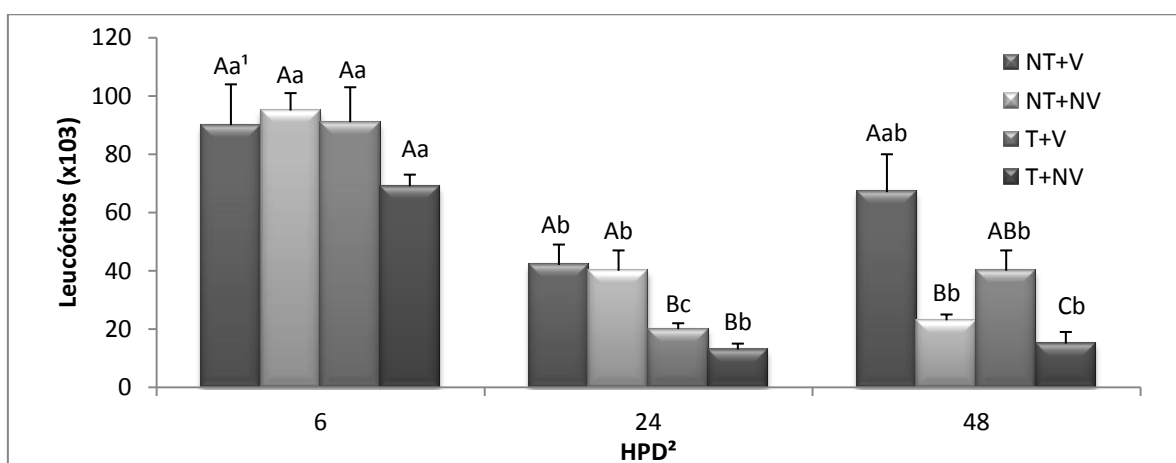


Figura 1: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados no estudo leucocitário de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada tempo analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo. ² T=tempo, TTO= Tratamento, VAC= vacinação. Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; 0 e 1,5 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

Animais desafiados e não vacinados (grupos: NT+NV e T+NV) apresentaram uma leucocitose aguda (6HPD), seguida por queda no total de leucócitos conforme o passar do tempo experimental. O grupo T+ NV demonstrou menores valores de leucócitos quando comparados aos outros grupos, marcado principalmente por linfopenia, monocitose e neutropenia em 48 HPD.

Tabela 4: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados no estudo diferencial leucocitário de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

Tempo ²	Tratamento ²	Vacinação ²	Linfócito		Monócito		Neutrófilo	
			(%)	(/μL)	(%)	(/μL)	(%)	(/μL)
Padrão fisiológico ³			75.16		4.16		20.66	
6	NT	V	76.00 ^{Aa}	54514 ^{Aa}	20.85 ^{Ab}	14874 ^{Aab}	3.14 ^{Aa}	2214 ^{Aab}
	NT	NV	80.75 ^{Aa}	75415 ^{Aa}	16.75 ^{Aa}	17313 ^{Aa}	2.50 ^{Ab}	22544 ^{Aa}
	T	V	78.42 ^{Aa}	71790 ^{Aa}	20.00 ^{Aa}	18135 ^{Aa}	1.57 ^{Aa}	1437 ^{Aa}
	T	NV	83.14 ^{Aa}	59614 ^{Aa}	15.85 ^{Aa}	11213 ^{Aa}	1.00 ^{Ab}	692 ^{Aa}
24	NT	V	80.62 ^{Aa}	40674 ^{Aa}	16.37 ^{Aab}	7906 ^{Ab}	3.00 ^{Aa}	1031 ^{Ab}
	NT	NV	86.00 ^{Aa}	34771 ^{Ab}	10.00 ^{Aa}	3658 ^{Ab}	4.00 ^{Ab}	1646 ^{Ab}
	T	V	75.00 ^{ABa}	17842 ^{Bb}	23.00 ^{Aa}	4944 ^{Ab}	2.00 ^{Aa}	492 ^{Ab}
	T	NV	69.14 ^{Bb}	8795 ^{Cb}	26.71 ^{Aa}	3814 ^{Aa}	4.14 ^{Ab}	736 ^{Ab}
48	NT	V	71.12 ^{Aa}	47103 ^{Aa}	24.12 ^{Aa}	17267 ^{Aa}	4.75 ^{Ba}	3297 ^{Aa}
	NT	NV	65.12 ^{Ab}	14801 ^{Bc}	23.87 ^{Aa}	5698 ^{Bb}	11.00 ^{Aa}	2539 ^{Bb}
	T	V	62.5 ^{Ab}	24700 ^{Bb}	32.87 ^{Aa}	13596 ^{Aa}	4.62 ^{Ba}	1776 ^{Aa}
	T	NV	62.57 ^{Ab}	9374 ^{Cb}	25.85 ^{Aa}	3773 ^{Ba}	11.57 ^{Aa}	1922 ^{Bb}
Tempo ⁴			13.78 ^{**}	51.01 ^{**}	20.78 ^{**}	1.22 ^{NS}	6.68 [*]	17.10 ^{**}
Tratamento ⁴			3.89 [*]	21.97 ^{**}	0.52 ^{NS}	0.00 ^{NS}	6.64 [*]	1.01 ^{NS}
Vacinação ⁴			0.04 ^{NS}	17.66 ^{**}	9.87 [*]	0.00 ^{NS}	2.10 ^{NS}	13.54 [*]
Tempo*Tratamento ⁴			2.58 ^{NS}	7.10 [*]	0.41 ^{NS}	3.13 [*]	2.93 [*]	0.23 ^{NS}
Tempo*Vacinação ⁴			0.86 ^{NS}	9.08 [*]	7.22 [*]	0.09 ^{NS}	0.17 ^{NS}	3.31 [*]
Tratamento*Vacinação ⁴			0.13 ^{NS}	1.80 ^{NS}	0.16 ^{NS}	0.21 ^{NS}	0.07 ^{NS}	0.09 ^{NS}
Tempo*Vacinação*Tratamento ⁴			1.08 ^{NS}	0.82 ^{NS}	0.04 ^{NS}	0.02 ^{NS}	1.38 ^{NS}	0.33 ^{NS}
Coeficiente de variação			15.42	5.21	83.67	27.85	46.13	8.64

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

² T=tempo, TTo= Tratamento, VAC= vacinação. Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; 0 e 1 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

³ Valor determinado (n=8) de tilápias sem nenhum estímulo, e mantidos nas mesmas condições experimentais (nutrição e ambiência).

⁴ Significância estatística: NS- não significativo para P>0,05; * - Significativo para P<0,05; ** - Significativo para P<0,01.

5.1.3 TROMBOGRAMA

A análise do trombograma demonstrou a ação da vacina nos grupos NT+V e T+V em manter os níveis próximos aos obtidos no grupo PF = $14,83 \times 10^3 \pm 4,26/\mu\text{L}$, na fase inicial de 6 horas, passando a trombocitopenia em 24HPD e recuperando esse valor em 48 HPD. Diferentemente dos animais não vacinados (NT+NV e T+NV) que apresentaram trombocitopenia em todos os tempos com quedas maiores em 24 e 48 HPD.

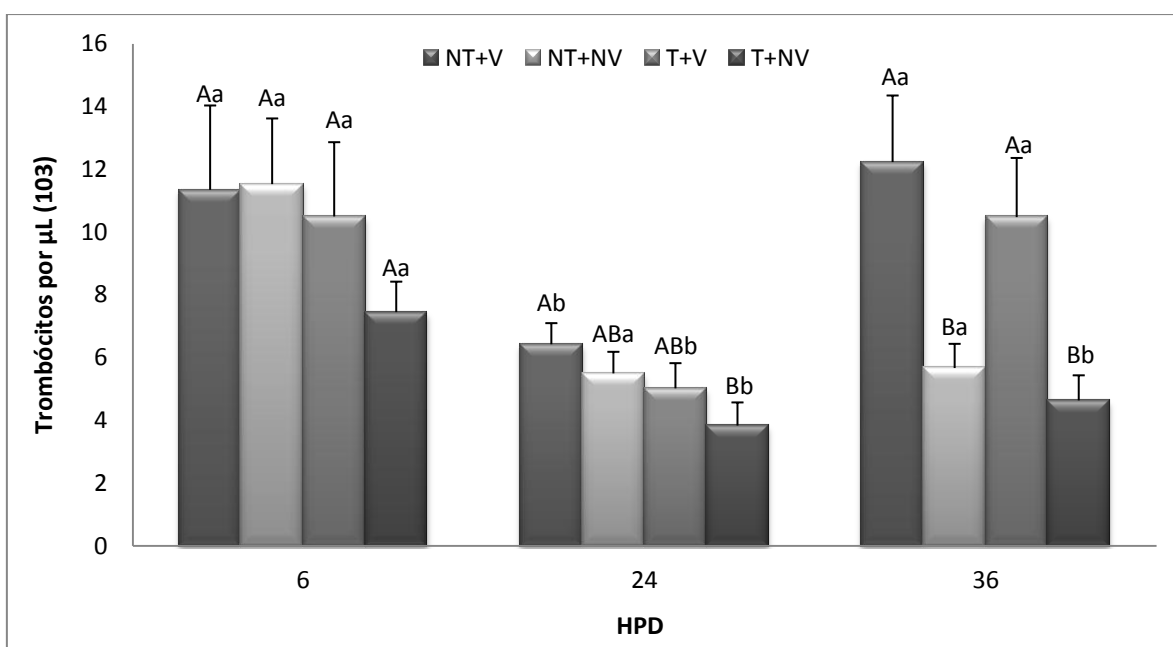


Figura 2: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados da contagem de trombócitos de Tilápias Vacinadas e Desafiadas com *Streptococcus agalactiae*, tratadas com Tilosina.

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo. ² Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; NT= não tratados com Tilosina e T= tratados com 1 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*. ³ Valor determinado (n=8) de tilápias sem nenhum estímulo, e mantidos nas mesmas condições experimentais (nutrição e ambiência).

5.3 Bioquímica sérico

Aumento na atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina foram observadas em peixes com aerocistite infecciosa quando comparadas aos animais controles (padrão fisiológico), sendo que a fosfatase apresentou pico na atividade enzimática na fase inicial 6 HPD enquanto a AST com 48 HPD. Na comparação entre os tratamentos, tilápias tratadas com tilosina e vacinadas (T+V) apresentaram diminuição significativa da atividade enzimática da fosfatase alcalina na fase mais aguda com 6 HPD quando comparado a animais não tratados com tilosina, inclusive somente este tratamento não apresentou variações significativas ($P>0,05$) para fosfatase alcalina entre os três períodos avaliados.

Peixes com aerocistite infecciosa por *S. agalactae* apresentaram aumento circulante de creatinina 6 e 24 HPD, exceto peixes tratados com tilosina e vacinados (T+V) que apresentaram recuperação dos níveis basais com 24 HPD. Enquanto nos demais tratamentos essa recuperação ocorreu 48 HPD.

O estudo do metabolismo energético dos animais com aerocistite revelou aumento nos valores circulantes de glicose e triglicérides associados à diminuição da quantidade de colesterol 6 HPD, porém não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, exceto peixes tratados com tilosina e vacinados (T+V) que apresentaram aumento significativo ($P<0,05$) de triglicérides. Peixes vacinados apresentaram recuperação dos níveis basais de triglicérides 24 e 48 HPD quando comparados às tilápias não vacinadas que apresentaram exaustão das reservas deste lipídeo.

Tabela 5: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados na avaliação bioquímica sérica de Tilápias Vacinadas e Desafiadas com *Streptococcus agalactiae*, tratadas com Tilosina.

Tempo ²	Tratamento ²	Vacinação ²	ALT ⁵	AST ⁵	Creatinina ⁵	FA ⁵	Glicose ⁵	Colesterol ⁵
Padrão fisiológico³			38.00	36.87	0.76	42.00	53.05	184.02
6	NT	V	29.62 ^{ABa}	49.00 ^{Aa}	1.25 ^{Aa}	73.37 ^{Aa}	71.62 ^{Aa}	148.12 ^{Ab}
	NT	NV	32.25 ^{ABa}	48.12 ^{Aa}	1.20 ^{Aab}	76.12 ^{Aa}	63.12 ^{Ab}	144.62 ^{Aa}
	T	V	21.87 ^{Bb}	45.50 ^{Aa}	1.31 ^{Aa}	58.75 ^{Ba}	75.28 ^{Aa}	137.75 ^{Ab}
	T	NV	39.25 ^{Aa}	48.62 ^{Aa}	1.13 ^{Aa}	73.00 ^{ABa}	76.87 ^{Aa}	140.75 ^{Ab}
24	NT	V	41.12 ^{ABa}	54.37 ^{Aa}	1.40 ^{Aa}	59.50 ^{Aab}	77.37 ^{Aa}	150.37 ^{ABb}
	NT	NV	45.37 ^{Aa}	55.12 ^{Aa}	1.33 ^{Aa}	44.37 ^{Ab}	80.62 ^{Aab}	138.62 ^{Ba}
	T	V	28.75 ^{Bb}	58.25 ^{Aa}	0.75 ^{Bb}	55.75 ^{Aa}	78.12 ^{Aa}	156.00 ^{ABab}
	T	NV	28.42 ^{Ba}	42.85 ^{Aa}	1.27 ^{Aa}	51.00 ^{Ab}	88.42 ^{Aa}	170.14 ^{Aa}
48	NT	V	31.50 ^{Aa}	51.37 ^{ABa}	0.73 ^{ABb}	50.50 ^{Ab}	76.87 ^{Aa}	175.12 ^{Aa}
	NT	NV	33.00 ^{Aa}	41.50 ^{Ba}	0.88 ^{ABb}	40.50 ^{Ab}	88.12 ^{Aa}	133.12 ^{Ba}
	T	V	42.37 ^{Aa}	62.75 ^{Aa}	1.11 ^{Aab}	48.62 ^{Aa}	75.37 ^{Aa}	174.87 ^{Aa}
	T	NV	36.71 ^{Aa}	56.71 ^{ABa}	0.65 ^{Ba}	40.57 ^{Ab}	70.42 ^{Aa}	124.28 ^{Bb}
Tempo⁴			1.44^{NS}	0.89^{NS}	6.62*	16.83**	1.48^{NS}	1.79^{NS}
Tratamento⁴			0.80^{NS}	0.50^{NS}	1.05^{NS}	0.75^{NS}	0.06^{NS}	0.23^{NS}
Vacinação⁴			1.31^{NS}	1.72^{NS}	0.02^{NS}	1.11^{NS}	0.23^{NS}	8.77*
Tempo*Tratamento⁴			4.93*	2.27^{NS}	2.03^{NS}	0.91^{NS}	1.48^{NS}	2.59^{NS}
Tempo*Vacinação⁴			1.53^{NS}	0.67^{NS}	1.68^{NS}	2.12^{NS}	0.44^{NS}	9.02*
Tratamento*Vacinação⁴			0.03^{NS}	0.15^{NS}	0.07^{NS}	1.39^{NS}	0.00^{NS}	0.55^{NS}
Tempo*Vacinação*Tratamento⁴			1.46^{NS}	0.86^{NS}	3.40*	0.24^{NS}	0.84^{NS}	0.88^{NS}
Coeficiente de variação			40.75	34	41.32	32.12	28.36	16.67

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

² Amostrados 6, 24 e 48 horas após o desafio bacteriano; 0 e 25 ppm de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; Vac=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

³ Valor de referência para tilápias sem nenhum estímulo e mantidas nas mesmas condições experimentais (mesma desova, nutrição e ambiência)

⁴ Significância estatística: NS- não significativo para P>0,05; * - Significativo para P<0,05; ** - Significativo para P<0,01

⁵ AST: Aspartato aminotransferase (U/L), ALT: alanina aminotransferase (U/L), FA: fosfatase alcalina (mg/dL), glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL), triglicérides (mg/dL) e creatinina (mg/dL).

5.4 Atividade respiratória dos leucócitos e de lisozima sérica

Animais T+V quando comparados ao PF mostraram uma queda em 6 HPD, passando por uma recuperação em 24 HPD e voltando a cair em 48 horas, diferentemente de animais não tratados e vacinados que não demonstraram esta recuperação. O grupo V+NT apresentou maior queda nos valores de Burst respiratório, sendo diferente de todos os outros tratamentos em 48 HPD ($P < 0.01$).

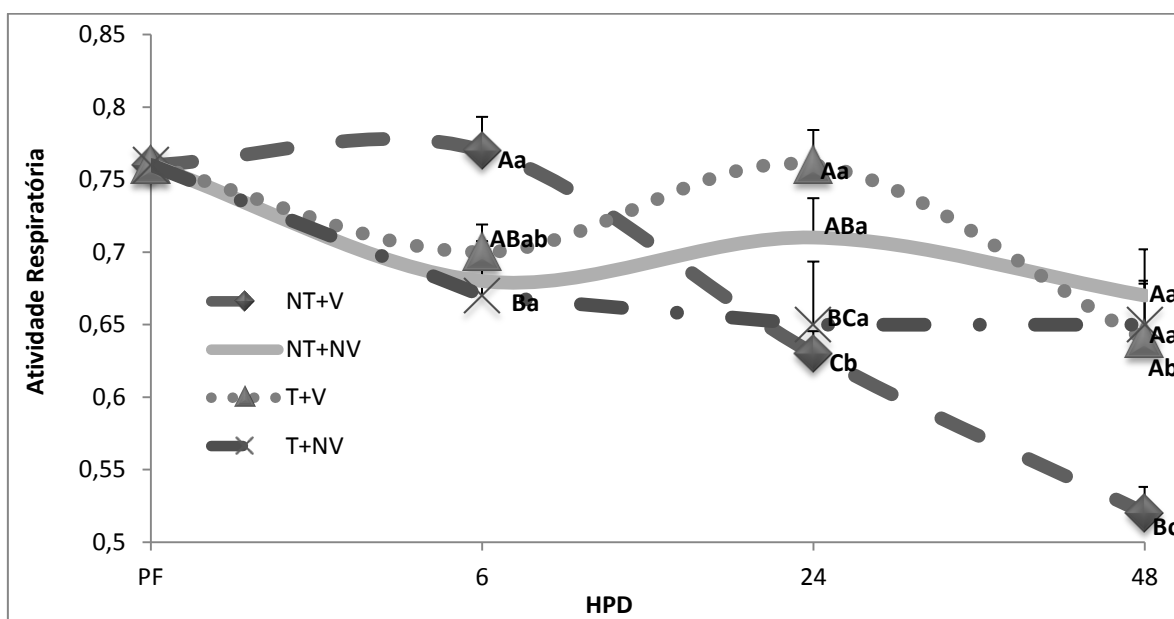


Figura 3: Valores médios ($n=8$) observados na atividade respiratória de leucócitos (Burst oxidativo respiratório) de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

¹ Valor determinado ($n=8$) de tilápias sem nenhum estímulo, e mantidos nas mesmas condições experimentais (nutrição e ambiência).² Absorbância 540nm. HPD³ Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; NT= não tratados com Tilosina e T= tratados com 1 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

A análise da concentração de lisozima (Figura 6) demonstraram um pico em 24 horas, sendo que animais não tratados demoraram mais para ter os valores aumentados (após 6 HPD) e em 48 HPD obtiveram maiores valores comparados aos outros grupos.

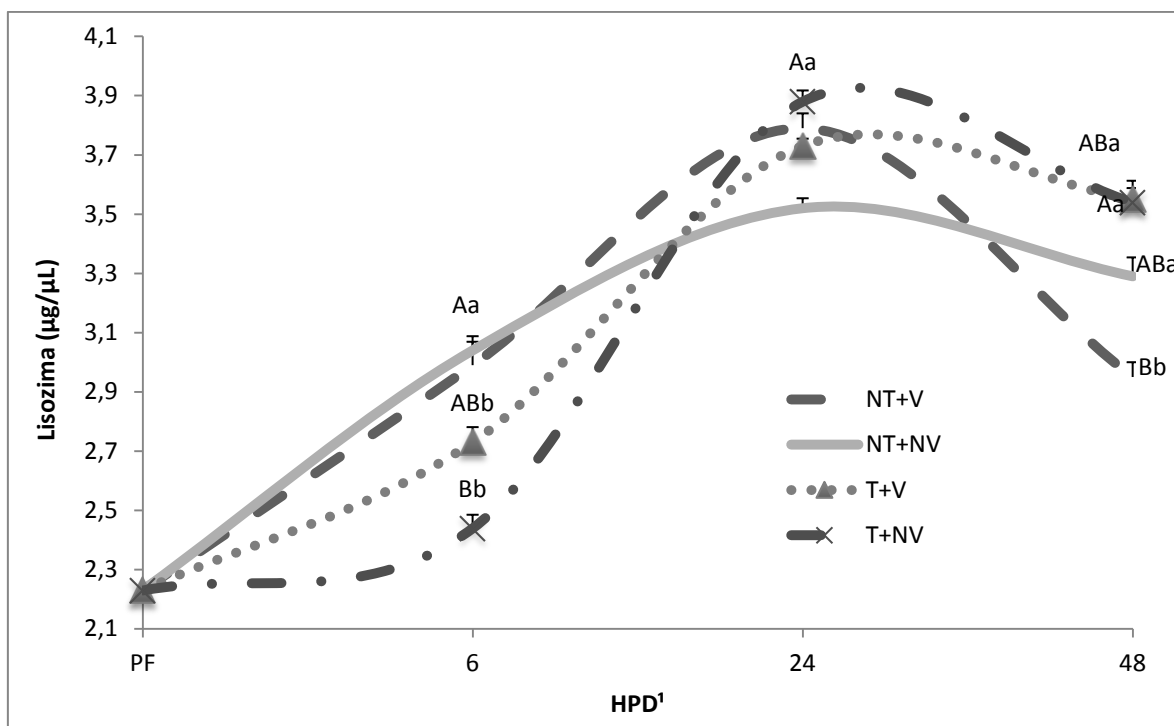


Figura 4: Valores médios (n=8) observados na concentração de lisozima de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

¹ Valor determinado (n=8) de tilápias sem nenhum estímulo, e mantidos nas mesmas condições experimentais (nutrição e ambiência).² Absorbância 540nm. HPD³ Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; NT= não tratados com Tilosina e T= tratados com 1 mg de tartarato de acil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

A análise de correlação entre neutrófilos e monócitos com os valores de Burst respiratório demonstrou-se interação altamente significativa, onde, quanto maior valor de burst maior número de neutrófilos e monócitos, principalmente em animais não vacinados ($P= 0.0227$), e em 48 HPD ($P= 0.0230$). Quando esta comparação se torna mais específica, somente com neutrófilos e níveis de burst, ocorreu interação principalmente em animais não vacinados ($P=0.0150$), animais tratados com tilosina ($P=0.0059$) e no período mais tardio 48 HPD ($P=0.0119$).

Quando correlacionados valores obtidos de lisozima com número de monócitos observou-se correlação de positiva de 40% ($P=0.0468$), mostrando a influência do tratamento com tilosina na resposta infecciosa.

Tabela 6: Análise de correlação entre os valores de atividade respiratória ou lisozima sérica ao número absoluto de neutrófilos e monócitos contados no sangue de tilápias submetidas aos diferentes tratamentos durante aerocistite infecciosa por *Streptococcus agalactiae*.

Parâmetros correlacionados ¹	Amostragem Experimental	Análise de correlação	
		ρ^2	Prob > $ \rho ^2$
(Neutr. + Mon.) X Burst	Todos animais (n=89)	0.3469	0.0011
	Não vacinados (n=42)	0.3510	0.0227
	48 HPI (n=34)	0.4073	0.0230
Neutrófilos X Burst	Todos animais (n=132)	0.2114	0.0150
	Não vacinados (n=67)	0.3713	0.0020
	48 HPI (n=46)	0.3679	0.0119
	Tilosina 1,5 (n=57)	0.3603	0.0059
Monócitos X Lisozima	Tilosina 1,5 (n=57)	0.4097	0.0468

¹ Número absoluto de monócitos e neutrófilos no sangue; atividade respiratória (Burst) e de lisozima no sangue.

² ρ^2 = Coeficiente de correlação de Spearman; Prob.> $|\rho|^2$ – Probabilidade de significância do valor de ρ .

5.5 Proteinograma

Todos os animais estudados apresentaram hiperproteinemia aguda (6 HPD) e queda destes níveis durante o processo experimental, com exceção do grupo T+V, onde, a associação da vacina com o tratamento incrementou as concentrações de proteínas totais, tendo pico em 48 HPD.

Animais vacinados e não tratados saíram da hiperproteinemia inicial (6HPD), para valores próximos ao grupo PF em 48 HPD, diferentemente de animais que dos grupos não vacinados que demonstraram hipoproteinemia em 48 HPD.

Os valores de albumina acompanharam os valores de proteínas totais, demonstrando melhores valores em animais vacinados, e principalmente quando associados ao tratamento, onde o grupo T+V manteve os níveis plasmáticos desta proteína próximo a valores do grupo PF. Observou-se hipoalbuminemia em animais tratados e não vacinados (T+NV) durante todos os períodos amostrais.

Tabela 7: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados na concentração de proteína total e albumina de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

Tempo ²	Tratamento ²	Vacinação ²	Proteína Total	Albumina
Padrão fisiológico³			3.09 ± 0.16	1.00 ± 0.13
6	NT	V	3.70 ^{Aa}	1.07 ^{Aa}
	NT	NV	3.50 ^{ABa}	0.92 ^{Aa}
	T	V	3.20 ^{Ba}	1.02 ^{Aa}
	T	NV	3.30 ^{ABa}	1.05 ^{Aa}
24	NT	V	3.35 ^{Aab}	1.05 ^{Aa}
	NT	NV	2.80 ^{Bb}	0.90 ^{Aa}
	T	V	3.32 ^{Aa}	1.04 ^{Aa}
	T	NV	3.00 ^{ABa}	1.08 ^{Aa}
48	NT	V	3.10 ^{Ab}	1.16 ^{Aa}
	NT	NV	2.40 ^{Bb}	0.88 ^{Ba}
	T	V	3.50 ^{Aa}	1.04 ^{ABa}
	T	NV	2.10 ^{Bb}	0.71 ^{Cb}
Tempo⁴			13.45^{**}	1.50^{NS}
Tratamento⁴			0.57^{NS}	0.06^{NS}
Vacinação⁴			24.21^{**}	14.24[*]
Tempo*Tratamento⁴			2.46^{NS}	3.60[*]
Tempo*Vacinação⁴			8.37[*]	4.94[*]
Tratamento*Vacinação⁴			0.18^{NS}	1.77^{NS}
Tempo*Vacinação*Tratamento⁴			2.81^{NS}	1.16^{NS}
Coeficiente de variação			15.42	17.84

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

² T=tempo, TTO= Tratamento, VAC= vacinação. Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; 0 e 1 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

³ Valor determinado (n=8) de tilápias sem nenhum estímulo, e mantidos nas mesmas condições experimentais (nutrição e ambiência).

⁴ Significância estatística: NS- não significativo para P<0,05; * - Significativo para P<0,05; ** - Significativo para P<0,01.

Os níveis de globulinas (relação proteínas totais e albumina) demonstraram principalmente a ação da vacina no incremento, animais vacinados e não tratados apresentaram pico plasmático em 24 HPD e em 48 horas alcançaram níveis basais. Diferentemente, peixes V+T tiveram pico em 48 horas, e animais não vacinados quando comparados ao grupo PF apresentaram valores inferiores.

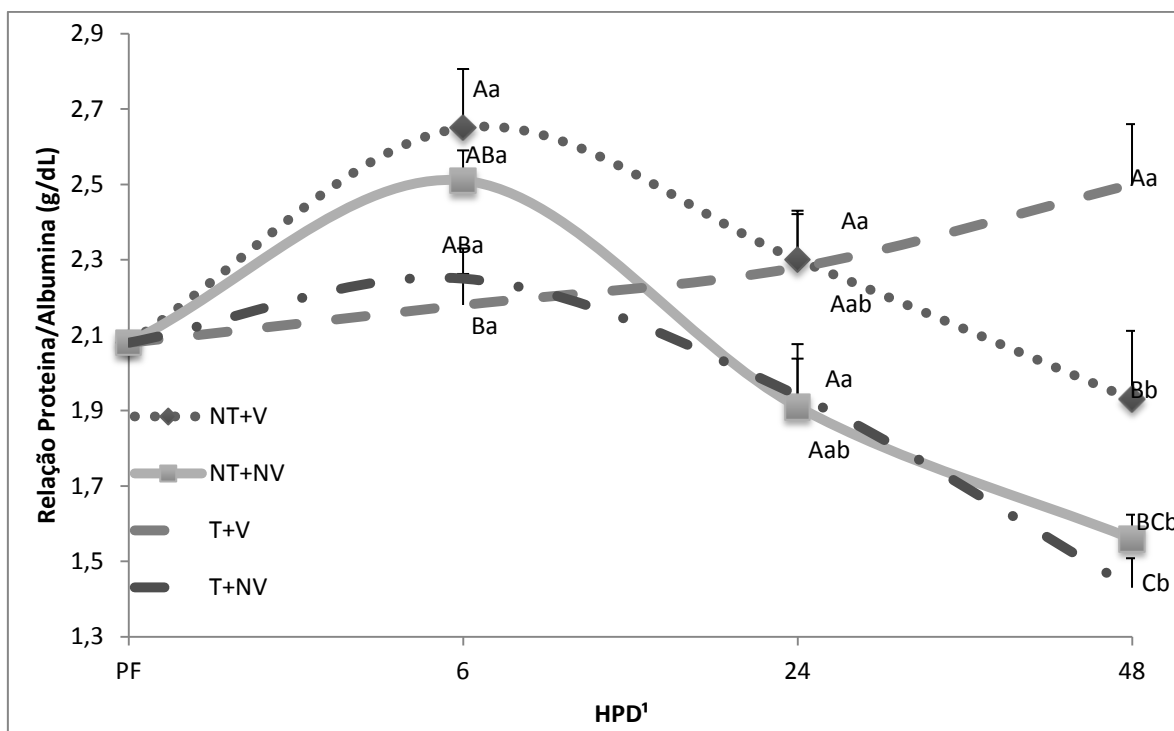


Figura 5: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados na relação entre a concentração de proteínas totais e albumina (globulinas) de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

Os níveis de haptoglobina tiveram diminuição conforme passar do tempo, sendo observado pico em 6 HPD em todos os grupos analisados. Sendo, maior a concentração desta proteína em animais tratados e vacinados e animais T+V.

A vacinação também influenciou nos níveis de ceruloplasmina, em 6 HPD animais vacinados apresentaram maiores valores de concentração desta proteína. Peixes T+V obtiveram maior incremento em 48 HPD, quando comparados aos outros grupos. Animais não vacinados não demonstraram alterações significativas durante o passar do tempo experimental.

O pico observado na avaliação da transferrina em animais dos grupos NT+V e T+ NV na fase mais aguda (6HPD), não foi observado em animais NT+NV e T+V, onde alcançaram pico em 24 horas. Já em 48 HPD, observou-se menor valor desta proteína em animais tratados (T+V e T+NV).

Tabela 8: Valores médios (n=8) e análise de variância¹ dos resultados observados na concentração de proteínas de fase aguda de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.

Tempo ²	Tratamento ²	Vacinação ²	Ceruloplasmina	Haptoglobina	Transferrina
Padrão fisiológico³					
6	NT	V	0.10 ^{ABa}	0.118 ^{Ab}	0.04 ^{ABa}
	NT	NV	0.07 ^{Ca}	0.095 ^{ABb}	0.03 ^{BCa}
	T	V	0.12 ^{Aa}	0.080 ^{Bb}	0.02 ^{Ca}
	T	NV	0.08 ^{BCa}	0.074 ^{Aa}	0.04 ^{Aa}
24	NT	V	0.05^{Bb}	0.063^{Ab}	0.03^{ABa}
	NT	NV	0.08^{Aa}	0.061^{Ab}	0.04^{Aa}
	T	V	0.06^{ABb}	0.059^{Ab}	0.03^{Aa}
	T	NV	0.08^{ABa}	0.055^{Aa}	0.01^{Bb}
48	NT	V	0.07 ^{Bb}	0.049 ^{Ba}	0.03 ^{Aa}
	NT	NV	0.08 ^{Ba}	0.047 ^{BCa}	0.03 ^{Aa}
	T	V	0.12 ^{Aa}	0.042 ^{Aa}	0.03 ^{Aa}
	T	NV	0.07 ^{Ba}	0.039 ^{Ca}	0.02 ^{Ab}
Tempo⁴			6.05*	37.55**	2.19^{NS}
Tratamento⁴			5.29*	1.63^{NS}	6.38*
Vacinação⁴			4.27*	4.08*	0.00^{NS}
Tempo*Tratamento⁴			0.96^{NS}	1.57^{NS}	1.35^{NS}
Tempo*Vacinação⁴			8.96*	5.79*	0.80^{NS}
Tratamento*Vacinação⁴			7.97*	0.53^{NS}	0.01^{NS}
Tempo*Vacinação*Tratamento⁴			2.19^{NS}	4.77*	7.44*
Coeficiente de variação			30.94	31.73	38.02

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

² T=tempo, TTo= Tratamento, VAc= vacinação. Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; 0 e 1 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

³ Valor determinado (n=8) de tilápias sem nenhum estímulo, e mantidos nas mesmas condições experimentais (nutrição e ambiência).

⁴ Significância estatística: NS- não significativo para P<0,05; * - Significativo para P<0,05; ** - Significativo para P<0,01.

5.6 Estudo do índice hepático, esplênico e renal somático

Tabela 9: Análise de correlação entre os valores de avaliação somática de tilápias submetidas aos diferentes tratamentos durante aerocistite infecciosa por *Streptococcus agalactiae*.

Tempo ²	Tratamento ²	Vacinação ²	IHS ⁵	IGS ⁵	ISS ⁵
Padrão fisiológico³			1.72 ± 0.15	0.12 ± 0.04	0.07 ± 0.02
6	NT	V	1.91 ^{Aa}	0.10 ^{Aa}	0.08 ^{Ab}
6	NT	NV	2.02 ^{Aa}	0.12 ^{Ab}	0.08 ^{Ac}
6	T	V	2.27 ^{Aa}	0.10 ^{Aa}	0.07 ^{Ab}
6	T	NV	1.96 ^{Ab}	0.10 ^{Ab}	0.05 ^{Ac}
24	NT	V	1.58 ^{Ba}	0.13 ^{Ba}	0.15 ^{Aa}
24	NT	NV	1.73 ^{ABa}	0.14 ^{ABab}	0.14 ^{Ab}
24	T	V	1.95 ^{ABab}	0.13 ^{Ba}	0.12 ^{Aab}
24	T	NV	2.10 ^{Aa}	0.17 ^{Aa}	0.13 ^{Ab}
48	NT	V	1.75 ^{ABa}	0.14 ^{Aa}	0.14 ^{Ba}
48	NT	NV	2.00 ^{Aa}	0.16 ^{Aa}	0.23 ^{Aa}
48	T	V	1.56 ^{Bb}	0.13 ^{Aa}	0.16 ^{Ba}
48	T	NV	1.55 ^{Bb}	0.13 ^{Ab}	0.23 ^{Aa}
Tempo⁴			4.48*	8.65**	45.34*
Tratamento⁴			0.55^{NS}	0.57^{NS}	0.48^{NS}
Vacinação⁴			0.37^{NS}	3.62*	5.55^{NS}
Tempo*Tratamento⁴			4.92*	1.56^{NS}	0.76^{NS}
Tempo*Vacinação⁴			0.77^{NS}	0.59*	6.67^{NS}
Tratamento*Vacinação⁴			1.56^{NS}	0.03^{NS}	0.04^{NS}
Tempo*Vacinação*Tratamento⁴			0.46^{NS}	0.74^{NS}	0.38^{NS}
Coefficiente de variação			23.41	28.03	36.97

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada dia analisado e letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento ao longo do tempo.

² T=tempo, TTo= Tratamento, VAC= vacinação. Períodos amostrados 6, 24 e 48 horas após o início do tratamento; 0 e 1 mg de tartarato de acetil isovaleril tilosina/Kg de ração; V=vacinados e NV= não vacinados com *S. agalactiae*.

³ Valor determinado (n=8) de tilápias sem nenhum estímulo, e mantidos nas mesmas condições experimentais (nutrição e ambiência).

⁴ Significância estatística: NS- não significativo para P<0,05; * - Significativo para P<0,05; ** - Significativo para P<0,01.

⁵ IHS: índice hepatossomático, ISS: índice esplenossomático e IRS: índice renal somático

Todos os grupos demonstraram aumento significativo nos índices esplenossomáticos, sendo observado que animais vacinados obtiveram menores valores quando comparados a não vacinados. O tratamento não demonstrou alterações significativas.

Resultados observados no estudo hepatossomático mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos na fase aguda (6HPD). No entanto, em 24 HPD o grupo T+NV demonstrou um aumento do IHP quando comparado aos outros grupos, também em 24 horas pode-se notar que animais V+NT tiveram menor valor do índice somático deste órgão. Já em 48 HPD todos os grupos se mostraram próximos ao PF, com exceção de animais que não foram vacinados e não tiveram tratamento (NT+NV), que se mantiveram acima dos valores basais (PF).

A avaliação renal somática demonstrou uma redução no período de 6 HPD em quase todos os grupos, com exceção de animais NT+NV que se mantiveram próximo ao grupo PF, este mesmo grupo apresentou aumento conforme o passar do tempo, tendo em 48 HPD o maior valor de IRS. animais vacinados não tiveram diferença estatística quando associados ao tratamento ou não. O tratamento com a tilosina (T+NV) incrementou o IRS em 24 diferentemente de quando associada a vacina, tendo pico em 48 HPD.

5.7 Estudo Histopatológico

No estudo histopatológico hepático, não observou-se em 48 HPI influência dos tratamentos em tilápias com aerocistite por *S. agalactiae*. Sendo que todos os animais afetados apresentaram desarranjo nos cordões, moderada necrose de hepatócitos, degeneração hidrópica e dilatação sinusóide hepática.

Na avaliação histopatológica 48 HPI do baço de tilápias desafiadas com *S. agalactiae* animais não vacinados e não tratados apresentaram congestão esplênica, todos os tratamentos apresentaram formações de centros de melanomacrófagos (CMM) e melanomacrófagos livre.

O coração dos animais do grupo controle pôde-se observar a disposição das fibras musculares estriadas cardíacas (miocárdio), a organização da serosa (pericárdio) e o revestimento interno das câmaras (endocárdio), os quais apresentaram padrão de normalidade para esse órgão. Em todos os tratamentos avaliados, observamos uma ligeira pericardite, sendo que animais não vacinados apresentaram maior celularidade na serosa.

Os cortes histológicos do encéfalo, feitos para a análise, mostram que a parte correspondente aos cortes foi a região tecto ótico, sendo observadas alterações histológicas nas meninges, tendo aumento de células inflamatórias e espessamento.

Histologicamente, o estomago da tilápia não se observaram variações significativas quanto à mucosa e a serosa, porém as glândulas gástricas de animais tratados com tilosina se mostrou mais espessa no estomago. Neste estudo observou-se um moderado aumento de células caliciformes na mucosa intestinal de todos os tratamentos quando comparados ao grupo controle.

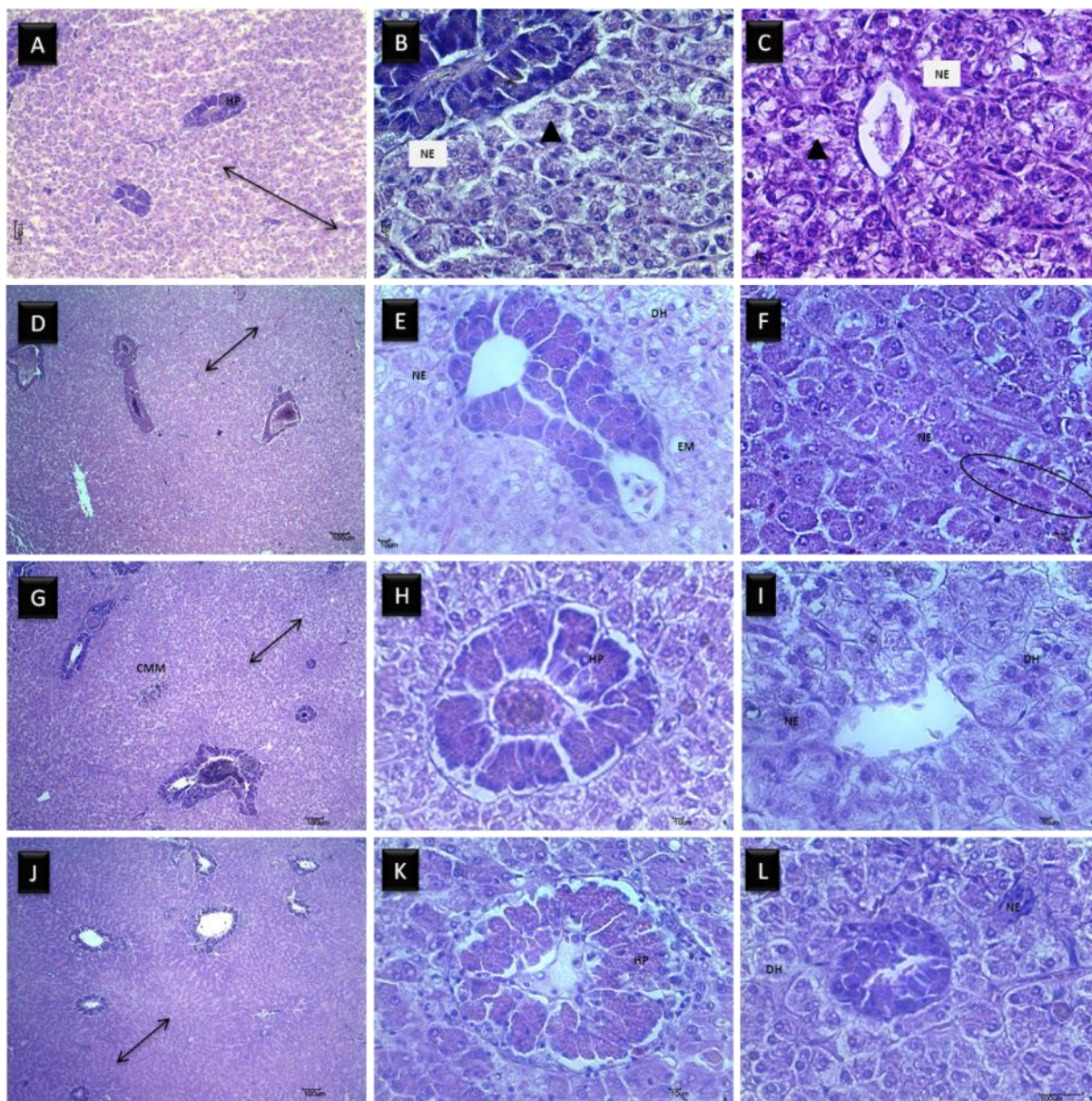


Figura 6: Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*. A (4x), B (40x) e C (40x) Tilápias Não tratadas e vacinadas. D(4x), E (40x) e F(40x) Não tratadas e não vacinadas. G (4x), H (40x) e I (40x) Tratadas com tilosina e vacinadas. J (4x), K (40x) e L (40x) Tratadas e não vacinadas. Seta preta: desarranjo nos cordões hepáticos, HP: hepatopâncreas, NE: necrose, DH e ponta seta: degeneração hidrópica, CMM: Centro de Melanomacrófagos, Circulo: Dilatação sinusóide hepática. Coloração H.E.

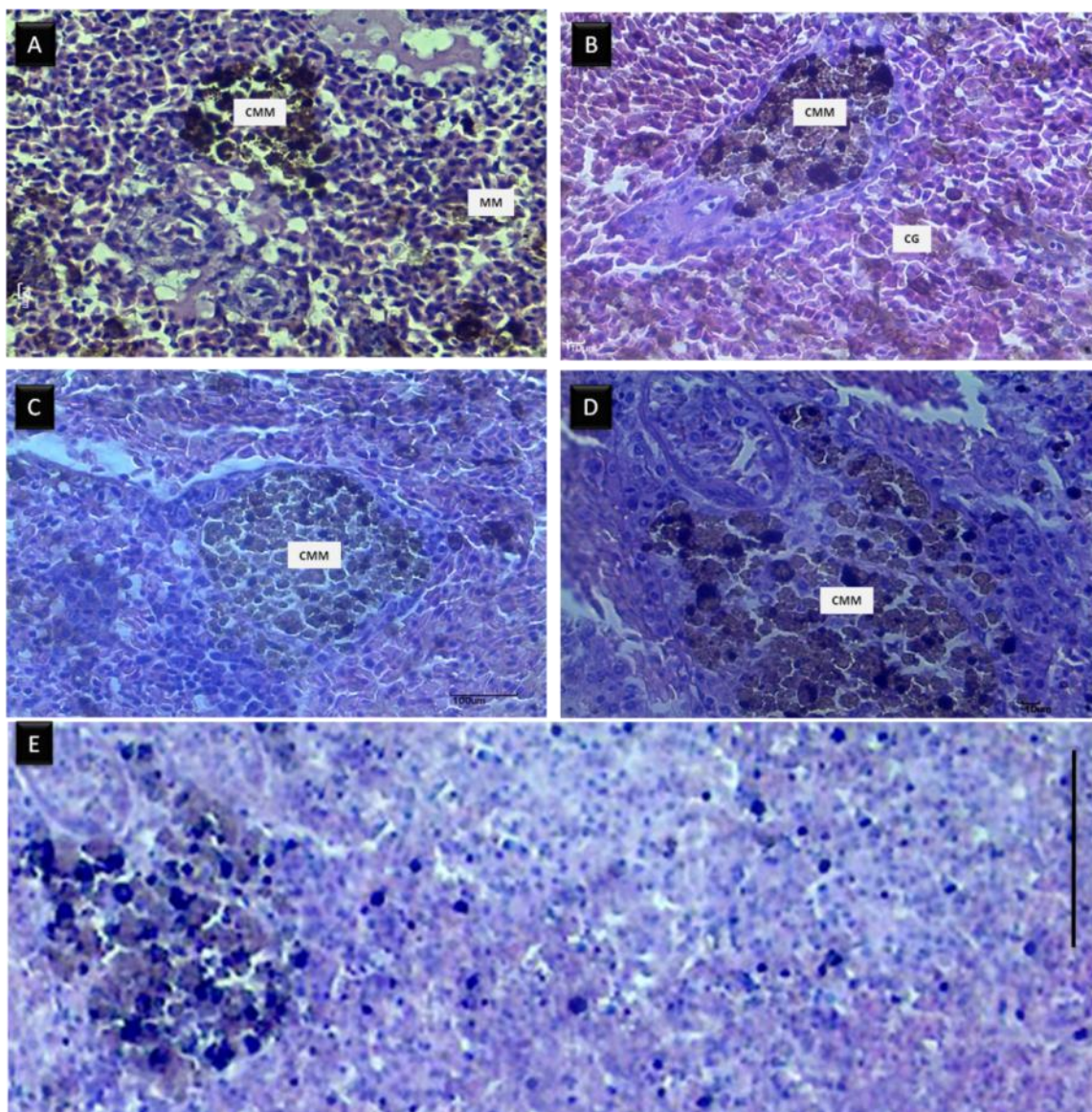


Figura 7: Fotomicrografia de corte histológico de baço de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*. CMM: Centro de Melanomacrófagos. A: Não tratado e vacinado (10x), MM: melanomacrófagos livres e acúmulo de lipofuscina. B: Não tratados e não vacinados (10x), CG: congestão. C: Tratados e vacinados (10x). D (10x) e E (4x) tratados e não vacinados. Coloração H.E.

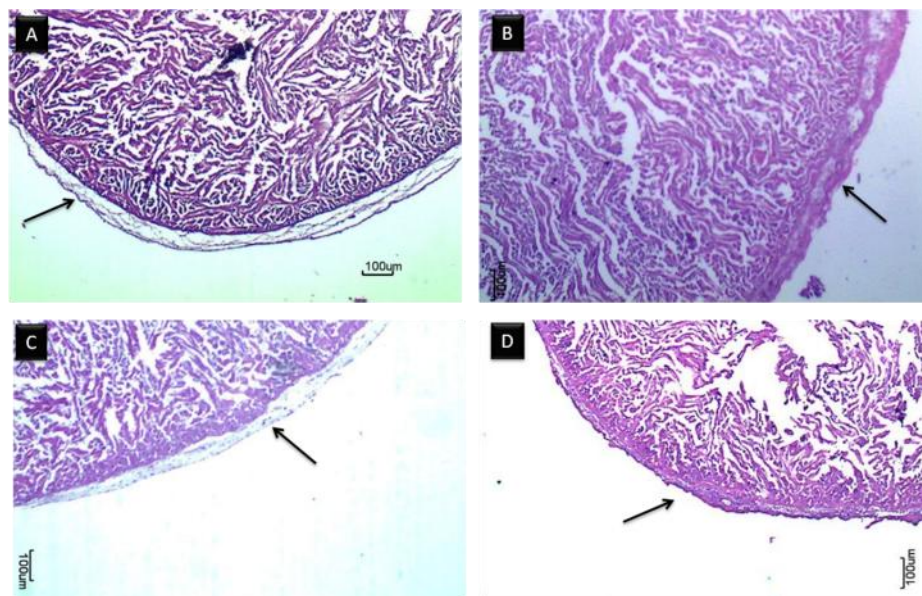


Figura 8: Fotomicrografia de corte histológico de coração de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.. A: Não tratado e vacinado (10x). B: Não tratados e não vacinados (10x). C: Tratados e vacinados (10x). D tratados e não vacinados (10x) Seta: pericardite com infiltrado inflamatório. Coloração H.E

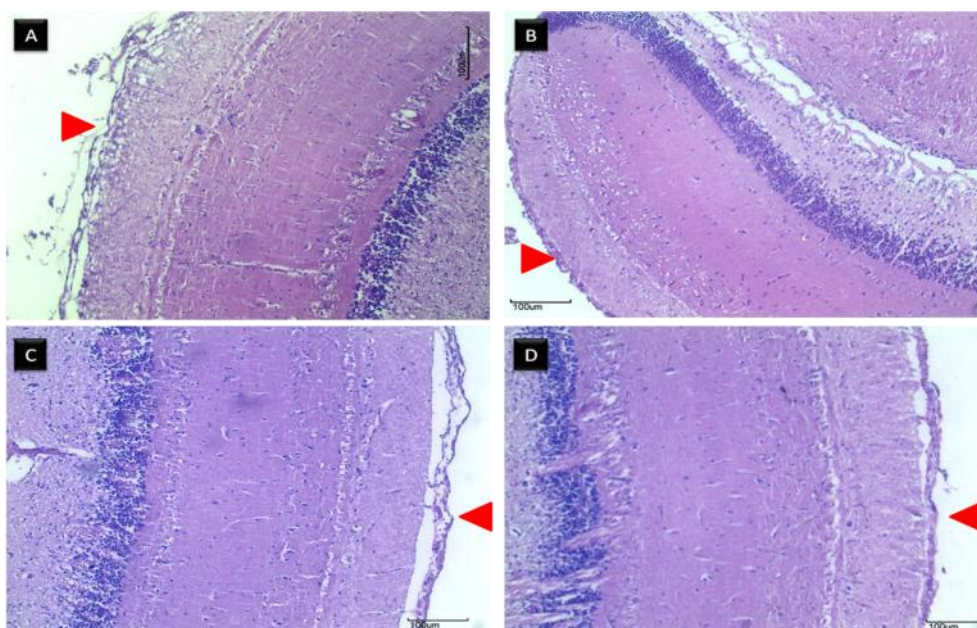


Figura 9: Fotomicrografia de corte histológico de cérebro (teto óptico) de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*.. A: Não tratado e vacinado (10x). B: Não tratados e não vacinados (10x). C: Tratados e vacinados (10x). D tratados e não vacinados (10x) Seta: meningite com infiltrado inflamatório. Coloração H.E..

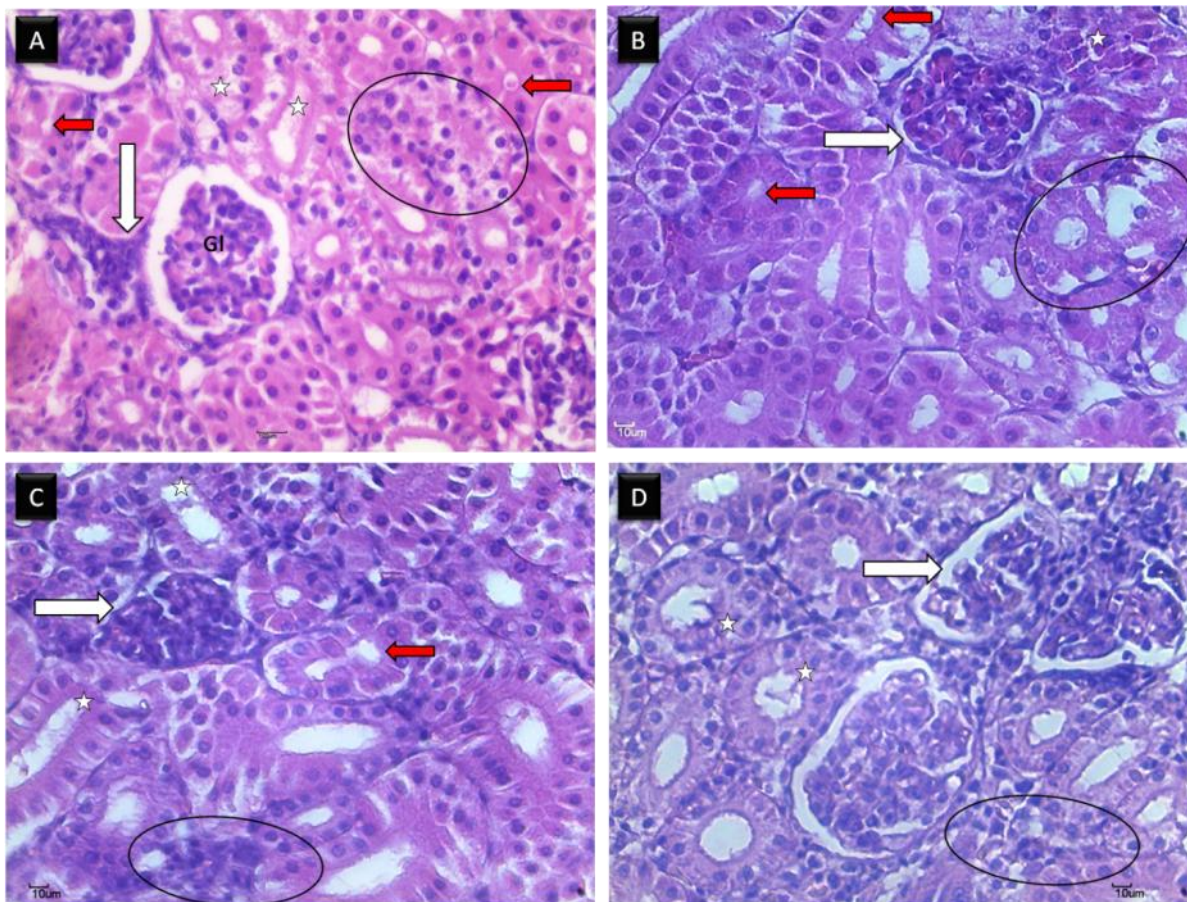


Figura 10: Fotomicrografia de corte histológico de rim caudal de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*. Coloração H.E.

A: Não tratado e vacinado (10x), seta branca: infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares, G: glomérulo, estrelas: edema, contorno: degeneração de túbulos renais, seta vermelha: diminuição da luz do túbulo renal.

B: Não tratados e não vacinados (10x). seta branca: perda do espaço de Bowman pelo aumento do tufo glomerular, estrelas: infiltrado inflamatório, contorno: degeneração de túbulos renais, seta vermelha: diminuição da luz do túbulo renal.

C: Tratados e vacinados (10x), seta branca: perda do espaço de Bowman pelo aumento do tufo glomerular, estrelas: edema, seta vermelha: diminuição da luz do túbulo renal, contorno: : infiltrado inflamatório.

D tratados e não vacinados (10x) seta branca: perda do espaço de Bowman pelo aumento do tufo glomerular, estrelas: edema, contorno: : infiltrado inflamatório

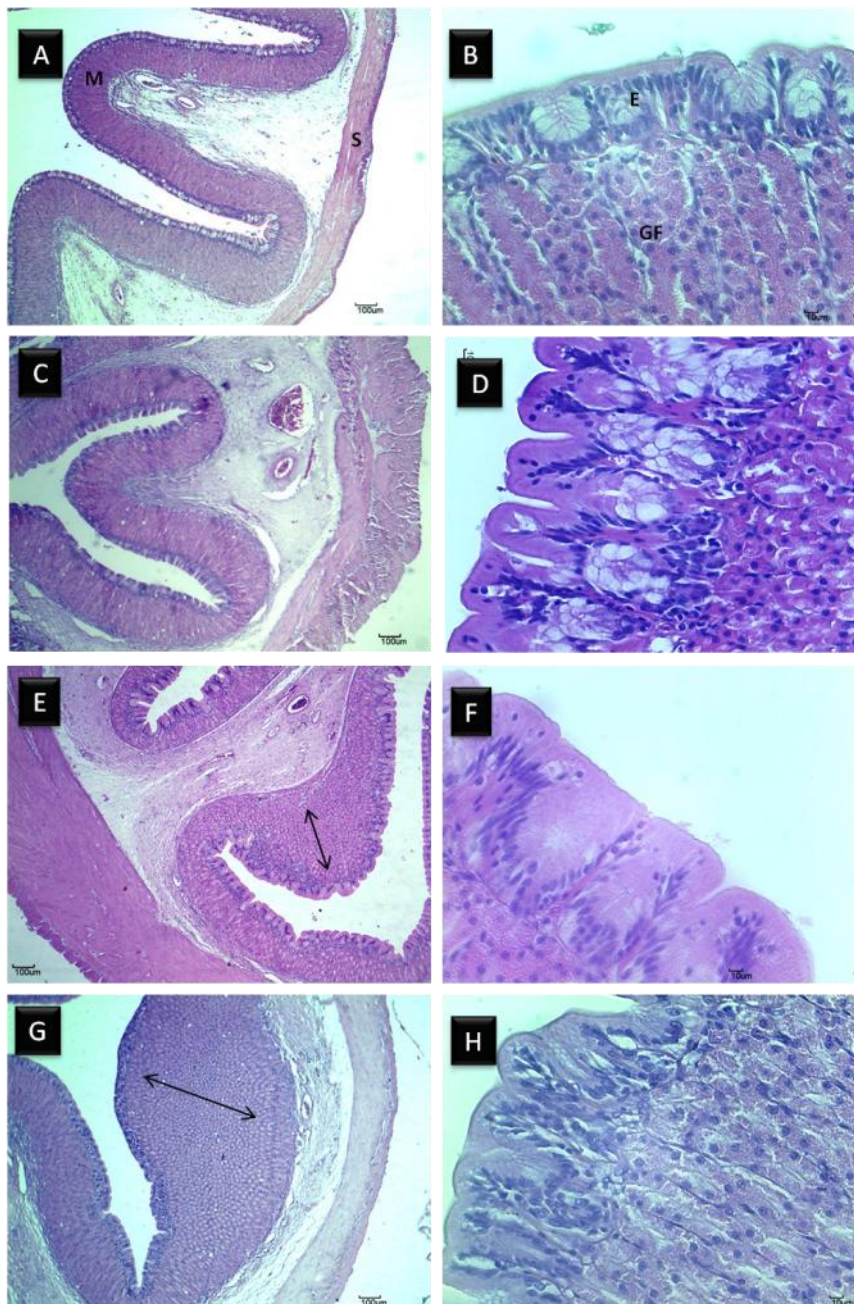


Figura 11: Fotomicrografia de corte histológico de porção proximal do estômago de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*. Coloração H.E. A (4x), B (40x) Tilápias Não tratadas e vacinadas. C(4x) e D (40x) Não tratadas e não vacinadas. E (4x) e F (40x) Tratadas com tilosina e vacinadas. G (4x) e H (40x) Tratadas e não vacinadas. M: mucosa, S: serosa, E: epitélio colunar, GF: Glândulas gástrica. Seta: aumento na mucosa, com aumento número de glândulas gástrica.

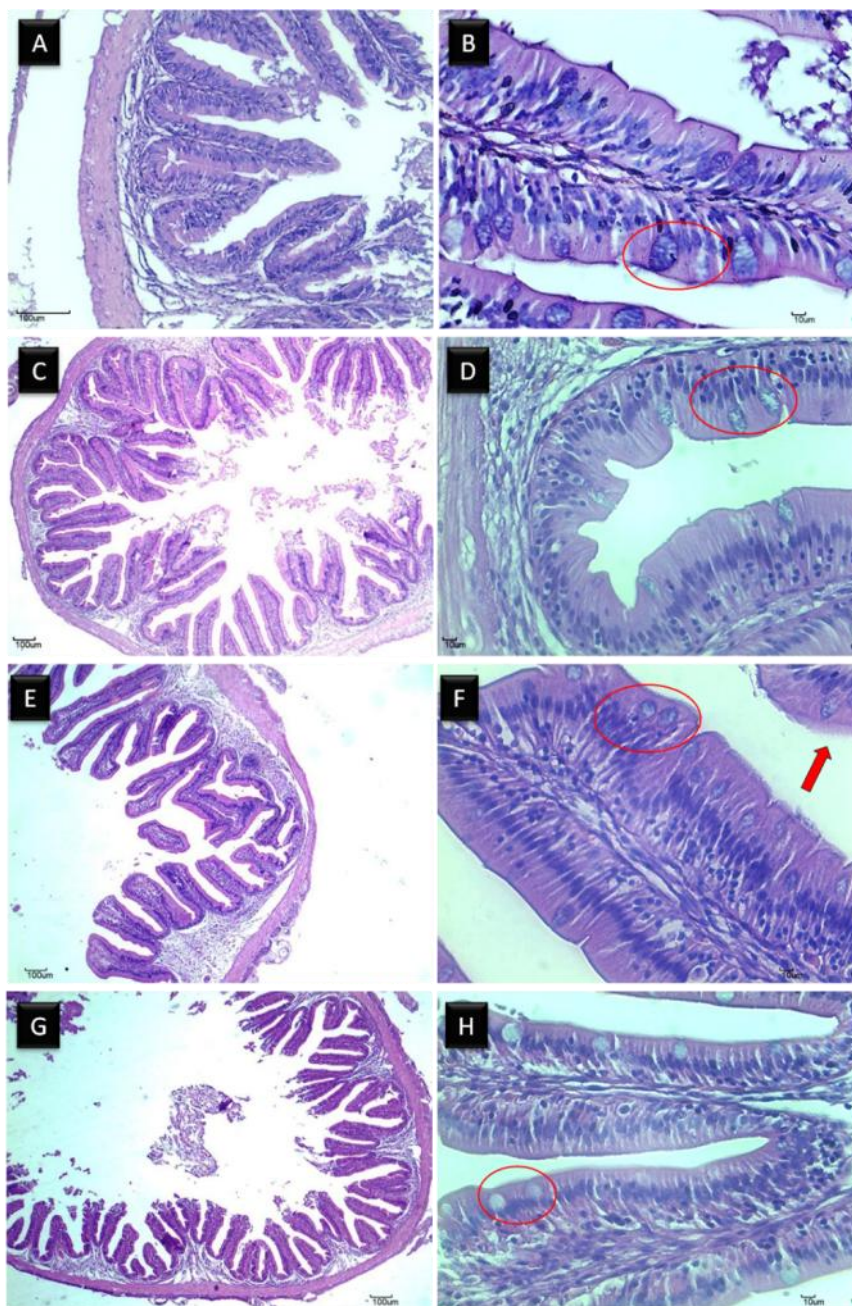


Figura 12: Fotomicrografia de corte histológico de porção proximal do estômago de tilápias, *O. niloticus*, submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *S. agalactiae*. Coloração H.E. A (4x),B (40x) Tilápias Não tratadas e vacinadas. C(4x) e D (40x) Não tratadas e não vacinadas. E (4x) e F (40x) Tratadas com tilosina e vacinadas. G (4x) e H (40x) Tratadas e não vacinadas. Seta: bordas em escova, Circulo ligeiro aumento de células de Goblet..

6. DISCUSSÃO

A avaliação do acúmulo celular da aerocistite demonstrou aumento significativo no número de células com relação ao tempo, alcançando pico em 48 HPD, diferentemente dos achados de Castro et al. (2014) que ao induzir a aerocistite por *Streptococcus agalactiae* em tilápias demonstrou pico celular em 24 horas e queda em 48 HPD. Tais achados corroboram com Moraes (2014), onde durante infecção por *Aeromonas hydrophila* atribuiu a diferença observada ao tipo de estímulo empregado, sendo, o estímulo da bacterina mais facilmente debelado pelo organismo.

A avaliação do acúmulo celular na aerocistite revelou-se predomínio de granulócitos no local inflamado em todos os tempos estudados, corroborando com achados de Endo et al. (1997) e Prado (2014). Segundo Good et al. (2012), os macrolídeos podem reduzir a inflamação eosinofílica, assim como efeitos na atividade dos neutrófilos através da inibição da sua migração para os sítios de inflamação, respaldando os achados em animais tratados e não vacinados, no qual apresentaram menores valores de granulócitos em todos os períodos amostrais, embora somente em 48 HPD esta redução foi significativa ($P < 0.001$).

Analisando a evolução da reação inflamatória da bexiga natatória em relação aos macrófagos, de um modo geral, o acúmulo ocorreu tardiamente no tempo de 48 HPI na maioria dos grupos. Na reação inflamatória de peixes teleósteos, grandes quantidades de macrófagos migram para o foco inflamado mais tardiamente corroborando os achados de Moraes et al. (2011) e Prado (2014), usando este mesmo modelo experimental em tilápias, Belo (2006) e Belo et al., (2012) verificaram aumento significativo no acúmulo de macrófagos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de tilápias e pacus durante reação inflamatória crônica tipo corpo estranho, respectivamente.

BEIGELMAN et al.(2009) afirmaram que independente de sua atividade antimicrobiana, os macrolídeos apresentam propriedades anti-inflamatórias, os achados deste estudo demonstram tal propriedade, sendo animais tratados com

tilosina apresentaram menores valores leucocitários quando comparados a animais não tratados, esta queda pode estar relacionada também ao efeito antimicrobiano deste fármaco debelando o processo infeccioso.

Peixes vacinados contra *S. agalactiae* e desafiados apresentaram leucocitose como reflexo de linfocitose em relação aos peixes não vacinados, tais achados se igualam aos de Barbuio (2013). O aumento de linfócitos em peixes vacinados também é notado neste estudo, porém na fase mais aguda (6HPD). A linfocitose em peixes pode sugerir um estímulo imune. Isto é comprovado pelo aumento no número destas células em tilápia do Nilo após vacinação, conforme observado por Bailone et al. (2010) e Barbuio (2013), estes autores verificaram que 48 horas após o desafio o número de linfócitos em peixes vacinados se manteve maior do que os peixes não vacinados, demonstrando forte incremento na resposta de defesa.

As alterações microcíticas e hiperocrômicas na fase inicial da resposta de defesa 6 HPD são comumente observadas em casos de deficiência de ferro (TVEDTEN, 2010) e de desequilíbrio líquido-eletrolítico por hiponatremia (BELO et al., 2014). Muitos microrganismos patogênicos necessitam de ferro para o seu crescimento, sendo capazes de competir com sucesso por estes íons nos tecidos e fluidos corporais do hospedeiro (NEVES et al., 2009).

De acordo com a revisão feita por Verschuere et al. (2000), diversos estudos comprovaram que a suplementação de ferro na dieta durante o curso de bacterioses resultou em aumento da mortalidade dos peixes. Alterações macrocíticas e normocrômicas são observadas em peixes apresentando insuficiência hepática durante casos de intoxicação por mercúrio, em surtos bacterianos por *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. e *Flavobacterium columnaris*, assim como, em peixes apresentando deficiência de íons de ferro (CLAUSS et al., 2008). Tilápias tratadas com tilosina e não vacinadas (T+NV) apresentaram alterações mais severas no quadro hematológico (48 HPD) com menor valor médio na contagem de eritrócitos, associado a diminuição significativa ($P < 0,05$) do hematócrito e na quantidade de hemoglobina. e conforme Grant (2015) estas alterações em conjunto ocorrem nos quadros de anemia.

O aumento da atividade sérica da fosfatase alcalina na fase inicial 6 HPD e AST em 48 HPD pode ser resultado de alterações patológicas no fígado, pois segundo Belo et al. (2012b) casos de citotoxicidade hepática ou alterações na permeabilidade da membrana dos hepatócitos podem resultar no extravasamento destas enzimas para a circulação sanguínea.

Na patologia clínica, o “clearance” da creatinina é realizado para avaliação e determinação da funcionalidade dos rins, tendo em vista que o aumento sérico da mesma pode ocorrer em casos de alterações e lesões renais, associadas à perda da capacidade de filtração glomerular (PIRARAT et al., 2012).

De acordo com (MOMMSEN et al., 1999), processos neoglicogênicos resultantes da participação de catecolaminas e glicocorticoides endógenos durante a resposta ao estresse aumentam a demanda metabólica e conseqüentemente os valores séricos de triglicerídeos e glicose. A biossíntese de cortisol nas células interrenais dos peixes é realizada a partir da degradação metabólica do colesterol (TORT, 2011), justificando os achados de diminuição deste lipídeo. Porém peixes vacinados apresentaram recuperação dos níveis basais 48 HPD.

Para Mommsen et al. (1999), as relações entre os valores séricos de cortisol e glicose, assim como as reservas de glicogênio são complexas e irão depender de inúmeros fatores, como intensidade do estímulo estressante, condição nutricional do animal, espécie de peixe, entre outros. Neste estudo, os achados comprovam o efeito benéfico da imunização das tilápias sobre o metabolismo energético durante aerocistite infecciosa por *S. agalactae*.

A atividade respiratória dos leucócitos demonstra a capacidade dos fagócitos em produzir espécies reativas de oxigênio, com o objetivo de atacar os patógenos invasores durante o processo de fagocitose, atuando sobre as membranas e destruindo os agentes invasores (BASHEERA-JOHN et al., 2002). Segundo Verlhac e Gabaudan (1997) assim que a fagocitose inicia, ocorre intenso aumento no consumo de oxigênio molecular (atividade respiratória). O aumento deste parâmetro mesmo sem diferença estatística sugere a melhora do sistema imunológico (FARIAS, 2012), em 6 HPD animais tratados (T+NV) demonstraram uma maior

resposta, diferentemente de animais vacinados que em 6 e 24 mantiveram maiores níveis deste parâmetro.

A lisozima é uma enzima importante capaz de causar lise em bactérias, encontrada em várias espécies de peixes (LIE et al., 1989). Em algumas situações suas concentrações podem sofrer alterações no sangue, como por exemplo em infecção ou estresse, ocorrendo variação nas células brancas (VERLHAC; GABAUDAN, 1997; WENDEELAR BONGA, 1997; MARTINS et al., 2000), pois os principais produtores de lisozima em peixes são os leucócitos, principalmente em neutrófilos, monócitos e em macrófagos (LIE et al., 1989). Durante análise de correlação entre valor achado de lisozima e quantidade monócitos circulantes, observou-se interação positiva de 40% em animais tratados com o macrolídeo. A determinação da concentração de lisozima é um parâmetro importante para a avaliação da imunidade inata nos peixes. Kumari e Sahoo (2006) concluíram que o uso de imunoestimulantes aumentam a concentração e atividade de lisozima, tal achado corrobora com os encontrados neste estudo onde animais tratados com tilosina apresentaram maiores valores de concentração de lisozima em 48 HPD.

Segundo Quintana (2002) os níveis de proteínas totais no plasma são alterados rapidamente após o início da reação inflamatória e pode durar por vários dias, dependendo da intensidade do estímulo. Resultados da literatura demonstram que peixes acometidos tanto por bactérias como por parasitos apresentaram redução nos níveis de proteínas do sangue (BOON et al., 1990). A albumina é a proteína mais abundante no plasma, responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico do sangue transporte e de nutrientes. As globulinas séricas são sintetizadas no fígado ou por células do sistema imunitário, e estão envolvidas diretamente nos mecanismos de defesa do animal (THOMAS, 2000).

Solter (1991) observou que avaliação da concentração haptoglobina e ceruloplasmina, foi até 6 vezes mais sensível do que da concentração de fibrinogênio ou leucócitos contagem na detecção de inflamação. A transferrina é uma glicoproteína, assim como a maioria das proteínas plasmáticas (KANEKO et al., 1997)

Segundo Gruys et al. (1994) a ceruloplasmina é uma glicoproteína (α -1), essencial para a eritropoiese por ser transportadora do cobre, tendo ação antioxidante nas células e tecidos, protegendo-os de compostos gerados por fagocitose de microorganismos e diminuição de neutrófilos endoteliais (CERÓN et al., 2005). Dentre as proteínas de fase aguda (PFA) analisadas, a ceruloplasmina foi, aparentemente, a de maior produção diante do processo inflamatório agudo, apresentando aumento discreto quando comparado ao das outras PFA, fato que também havia sido observado por Kogika et al. (2003). Conner et al. (1988) afirmou que a ceruloplasmina é liberada na circulação sangüínea imediatamente após a instalação do processo inflamatório. Assim, a ceruloplasmina poderia ser determinada como um indicador precoce do processo inflamatório Kogika et al. (2003). A vacinação influenciou nos níveis de ceruloplasmina, em 6 HPD animais vacinados apresentaram maiores valores de concentração desta proteína.

A haptoglobina é uma proteína α -2 responsável pelo transporte de hemoglobina nas células do sistema mononuclear fagocitário para que haja a recuperação do íon ferro durante o processo de hemocaterese e na defesa contra microorganismos. A concentração da haptoglobina aumenta em resposta a diversas situações: estresse orgânico, infecção, inflamação aguda ou necrose tecidual (CORAZZA, 1997). Os níveis de haptoglobina tiveram diminuição conforme passar do tempo, sendo observado pico em 6 HPD em todos os grupos analisados. Os níveis de haptoglobina caem após um processo hemolítico ou em doenças hepáticas. Neste estudo observou-se a diminuição no volume dos eritrócitos provavelmente por um desequilíbrio hidroeletrólítico causado pela infecção.

O fígado de teleósteos é um órgão multifuncional, envolvendo atividades como conversão do alimento e até desintoxicação de compostos estranhos (STEGEMAN; LECH, 1991). Entre as funções hepáticas mais importantes, destacam-se a formação de: proteínas plasmáticas, uréia e síntese de certos aminoácidos (Honorato et al. 2013). Sendo assim disfunções hepáticas graves causada por várias etiologias, podem propiciar um quadro irreversível, levando em alguns casos a diminuição da taxa de crescimento, e a morte do animal. (RAŠKOVIĆ et al. 2011).

O parênquima do tecido hepático da tilápia é composto por hepatócitos, veias centrais, capilares sinusóides e hepatopâncreas exócrino. A partir das veias centrais partem capilares sinusóides formando arranjos cordonal, os hepatócitos apresentam citoplasma claro, levemente arredondado com núcleo levemente deslocado para a periferia da célula e com nucléolo evidente (BARBUJO, 2013). Todos animais infectados apresentaram desarranjo nos cordões, moderada necrose de hepatócitos, degeneração hidrópica e dilatação sinusóide hepática. Tais achados demonstram aumento da atividade enzimática do fígado, causado pelo metabolismo de toxinas da bactéria (CARRASCHI et al., 2012). As áreas de necrose focal encontradas nos animais infectados com *S. agalactiae* corroboram com os achados de Zamri-Saad et al. (2010). Alterações como vacuolização dos hepatócitos, infiltrados inflamatórios e alteração no formato dos vasos sinusóides podem ser interpretados como respostas ao estresse, sendo, desta forma, considerados como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (TEH et al., 1997).

As alterações provocada pela infecção natural por *S. agalactiae* em tilápias foram observadas pela associação da presença das colônias bacterianas, exotoxinas, e lesões do fígado, baço, rins e cérebro (ZAMRI-SAAD et al., 2010). Histologicamente ocorre severa inflamação granulomatosa inclusive, necrose, vacuolização de hepatócitos e congestão esplênica em animais com estreptococose (EVANS et al., 2000).

O baço e o rim cefálico, são os principais órgãos hematopoiéticos, uma vez que os centros hematopoiéticos desses órgãos são responsáveis pela origem e formação dos eritrócitos, linfócitos, monócitos, trombócitos e granulócitos (PIMPÃO, 2006). Segundo Carneiro (1999) o baço constitui importante órgão de defesa contra microrganismos que penetram nos vasos sanguíneos, em virtude da riqueza de células fagocitárias, sendo o principal órgão destruidor de eritrócitos.

ROBERTS (1981) definiu CMM como fagócitos originários de monócitos circulantes e que apresentam seus graus de pigmentação variando de acordo com a espécie estudada e a idade e estado de saúde do animal, o colorido dos pigmentos varia do negro ao amarelo, dependendo do tipo de material fagocitado, o qual poderia ser de natureza melânica, lipofuscínica, ceróide ou hemossiderínica. São

inúmeras as funções atribuídas aos melanomacrófagos, tais como: fagocitose de bactérias. Os CMM são considerados parte integrante do sistema hematopoiético de teleósteos (ROBERTS, 1975).

Por ser um órgão de grande fluxo sanguíneo e com elevada presença de compostos químicos o rim pode sofrer mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, levando a redução do espaço de Bowman, além do aparecimento de células sanguíneas ou agregados de células sanguíneas ou de matéria estranha no espaço de Bowman (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

A camada de muco constituído por glicoproteínas insolúveis em água secretada pelas células caliciformes tem papel importante na proteção contra infecções, pois impede o contato de microrganismos com as células epiteliais e tem efeito bactericida devido à presença de lisozima e ácidos graxos de baixo peso molecular (NOGA 1995), cuja função principal é proteger e lubrificar o revestimento do intestino (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

7.CONCLUSÃO

A associação da vacinação e o tratamento com tilosina auxiliou as respostas de defesa orgânica das tilápias (*O. niloticus*) amenizando as alterações deletérias observadas na estreptococose, demonstrando o efeito imunomodulador do macrolídeo tilosina sobre a reação inflamatória.

8.REFERÊNCIAS

ABEYTA Jr, C., KAYSNER C.A., WEKELL M.M., SULLIVAN STELMA, G.N. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an. Recuperação de *Aeromonas hydrophila* de ostras implicado em um outbreak of foodborne illness. surto de doenças transmitidas por alimentos. **Journal of Food Protection**. 49: 643-646. 1989.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – **Método de ensaio com peixes**. São Paulo, 19 p. 2004.

ABREU, J.S. et al. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.4, p.31-47, 2009.

ALEXANDRINO,A.C.;OKUMURO,M.P.M.;BALDASSI,L;ARAUJO,A.P.;KURODO,C.K.;ARAUJOC.K.;WALKASA,Y.S.Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-irís(*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intense-relato de caso. **Boletim Instituto Pesca**,v.26,n.1,p.111-117,2000.

AUSTIN,B; AUSTIN,D.A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Chichester:Springer Praxis, 3rdEdition, 1999, 459p.

BAILONE, RL., MARTINS, ML., MOURIÑO, JLP., VIEIRA, FN., PEDROTTI, FS., NUNES, GC. and SILVA, BC., Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de Medicina Veterinaria*, vol. 42, no. 3, p. 221-7. 2010.

BARBUIO, R. "**Hematologia e histopatologia de tilápias (*Oreochromis niloticus*) vacinadas e desafiadas com *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae***". Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, FCAV- UNESP de Jaboticabal. viii, p. 46. 2011

BASHEERA JOHN M, CHANDRAN MR, ARUNA BV, ANBARASU K Production of superoxide anion by head-kidney leucocytes of Indian major carps immunised with bacterins of *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunol** 12: 201-207, 2002:

BEIGELMAN A, LEVY J, HADAD N, PINSK V, et al. Abnormal neutrophil chemotactic activity in children with congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): the role of nerve growth factor. **Clinical Immunology**. 130: 365-372. 2009.

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

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

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

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

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

BILLER-TAKAHASHI JD, TAKAHASHI LS, SAITA MV, GIMBO RY, URBINATI EC. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**. 73(2): 425-429, 2013.

BOON, J. H.; CANNAETS, V. M. H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M. A. M.; CHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective Larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of European Eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, v. 87, n. 3, p. 243-253, 1990.

BOTSOGLOU N.A. , FLETOURIS D.J. Antimicrobial drugs. In: **Drug Residues in Foods**. Pharmacology, Food Safety, and Analysis., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, pp. 27-115. 2001.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University. 1990.

BOZZO; F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES; F. R.; PEREIRA; G. T.; TAVARES DIAS; M.; ONAKA, E.M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*,

HOLMBERG, 1887.(characidae). **Journal of the World Aquaculture.**, v. 38, n. 2, p.302-308, 2007.

BROWN, E.D.; VIVAS, E.I.; WALSH, C.T.; KOLTER, R. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*". **Journal of Bacteriology.** v.177, n.14, p.4194–4197, 1995.

BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. *Aeromonas hydrophila e Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *sobria* como intoxicação alimentar espécies potenciais.Revisão. **Journal of Food Safety.** v. 7, p. 15–29, 1985.

BUNCH, E. C.; BEJERANO, I. The effect of environmental factors on the susceptibility of hibrid tilapia *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus* to streptococcosis. Israeli J. **Aquaculture**, v.49, n.2, p.67-76, 1997.

BURROWS G.E. Pharmacotherapeutics of macrolides, lincomycins, and spectinomycin. **American Veterinary Medical Association.** 176, 1072-1077. 1980.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. **Aquaculture. Res.**, v.32, p. 297-304, 2001.

CASTRO, M.P.; CLAUDIANO, G.S.; BORTOLUZZI, N.L.; GARRIDO, E.; FUJIMOTO, R.Y; BELO, M.A.A.; SHIMADA, M.T.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Chromium carbocholate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, v. 432, p.114-118, 2014a.

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

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, p. 85-99, 2005.

CIPRIANO,R. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. In: **Fish diseases of Leaflet.** United States Department of the Interior. Fish and Wildlife service Division of Fishery Research, Washigton, p.68,2001.

CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; CASTRO, M.P.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSSO, P.F.; BELO, M.A.A.. MORAES, J.R.E.; MORAES,

F.R., Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish & Shellfish Immunology**, 34, 1057-1062. 2013.

CLAUSS, T.M.; DOVE, A. D.M.; ARNOLD, J.E., Hematology disorders of fish. **Vet Veterinary Clinics: Exotic Animal**, 11, 445-462, 2008.

COLONNA M, PULENDRAN B, IWASAKI A. Dendritic cells at the host pathogen interface. **Nature Immunology**, v.7(2), p.117-120, 2006. Conner et al. (1988

CONROY, G; CONROY, D.A. **Patología de Tilápias: Una Reseña General**. Páginas 221-253, in M.J.T. Ranzani-Paiva; R.M. Takemoto; M.A.P. Lizama, editores. Sanidade de Organismos Aquáticos, Livraria Varela, São Paulo, Brasil, SP, 2004.

DOOLEY, J.S.H.; TRUST, T.J. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-Layer protein. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.499-506, 1988.

ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERTSON, B.S.; VAN MUISWINKEL, W.B. (Ed.). **Techniques in fish immunology**. [S.I.]: SOS publications, p.101-103. (Fish immunology technical communications, 1), 1990.

ENDO, M.; Arunlertae, C.; Ruangpan, L. A new method for collection neutrophils using swim bladder. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 63, n. 4, p. 644-645, 1997.

EVANS, J. J.; SHOEMAKER, C. A.; KLESZIUS, P. H. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. **Aquaculture**, v.189, p.197-210, 2000.

FARIAS, T.H.V. **Probiótico Na Alimentação do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Avaliação Hematológica, Bioquímica, Imunológica e Desempenho Produtivo**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista. 92 p. 2012.

FDA – Food and Drug Administration. **Animal and Veterinary: Approved Drugs 2012**.

<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm>. Acessado 15 de novembro de 2012.

FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. 5°. ed. Philadelphia: Lippincot Willians & Wilkins, 2000.

FITZSIMMONS, K. **Tilapia: the most important aquaculture species in the 21 st century**. Pages 3-8 in K. Fitzsimmons and J. Carvalho, editors. *Tilapia Aquaculture*

in the 21 st century: Proceedings from the 5th International Symposium on Tilapia Aquaculture. American Tilapia Association Society, Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

FLORES, R., FILHO, M. Como multiplicar os peixes? **Perspectivas da aquicultura brasileira**. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?pid=S0009-67252013000200002&script=sci_arttext. Acesso em: Setembro de 2013.

FODOR, L. et al. Efficacy evaluations of the use of oral tilmicosin in pneumonic calves. **Vet J**, 159:194–200; 2000.

GOOD, J.T. JR; ROLLINS, D.R.; MARTIN R.J.; Macrolides in the treatment of asthma. **Current opinion in pulmonary medicine**,18(1):76-84, 2012.

GRANT K.R.; Fish Hematology and Associated Disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Volume 18, Issue 1, January 2015, Pages 83–103

GRIF, K.; DIERICH, M.P.; PFALLER, K.;MIGLIOLI, P.A.; ALLERBERGER, F. In vitro activity of fosfomycin in combination with various antistaphylococcal substances". **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, n.2, p.209–17, 2001.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, New York, v. 64, p. 1009-1018, 1994.

GUTIERREZ, L.; OCAMPO, L.; ROSARIO, C.; SUMANO, H. Pharamacokinetics of disodium fosfomycin in broilers and dose strategies to comply with its pharmacodynamics versus *Escherichia coli*. **Poultry Science**, v.89, n.10, p.2106-2115, 2010.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. TRIMMED SPEARMAN – Karber methodo for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays; **Environmental Science & Technology**, Iowa, v.7, p.714-719, 1977.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.83, p.1S–11S , 1997.

HEMPEL, E. **Tilapia, the new whitefish**. Seafood International, AGRA Europe, London, 17(10):16-20, 2002.

HIRSCH, D.; JÚNIOR, D.J.P.; LOGATO, P.V.R.; PICCOLI, R.H.; FIGUEIREDO, H.C.P.; Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas*

móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

JAFFE, A.; BUSH, A.; Anti-inflammatory effects of macrolides in lung disease. **Pediatric Pulmonology**, 31: 464-473, 2001.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, diseases presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.332-344, 1998.

JARVA H, et al. Complement resistance mechanisms of streptococci. **Molecular Microbiology**, 40:95-107, 2003.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 932 p. 1997.

KIROV, M. et al. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* Species. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.547-555, 2002.

KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª Ed., Mc.Graw Hill, Rio de Janeiro, 2006, p.1573-1584.

KOGIKA, M. M.; PEREIRA, D. A.; ELIAS, F.; NOTOMI, M. K. ; DELAYTE, E. H.; KAWAHARA, R.; HAGIWARA, M. K. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e glicoproteína ácida em cães com gastroenterite hemorrágica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 513-517, 2003.

KOHRI, K. et al. Macrolide antibiotics inhibit nitric oxide generation by rat pulmonary alveolar macrophages. **Eur Respir J**, 15:62-7, 2000.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v.29, p.95-101, 2006

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAKRITZ, J. et al. Tilmicosin reduces lipopolysaccharide-stimulated bovine alveolar macrophage prostaglandin E(2) production via a mechanism involving phospholipases. **Vet Ther**, 3:7-2, 2002.

LEE, W.D. et al. Tilmicosin-induced bovine neutrophil apoptosis is cell-specific and downregulates spontaneous LTB₄ synthesis without increasing Fas expression. **Vet Res**, 35:213–24, 2004.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.6, p.1-5, 1989.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum** v.22, p.545-552, 2000.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M. et al. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunological Investigations**, v.28, p.89-101, 1999.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. 1996. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, 33(1):5-10.

MELO, G.; NIKOLIK, G. Brazilian Aquaculture – a Seafood Industry Giant in the Making. **Rabobank Industry Note**. v.362. 11p. 2013.

MERINO, S. et al. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v.28. p.157-168, 1995.

MOMMSEN, T.P.; VIJAIAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, p.211-268, 1999.

MORAES, A. C. "**Participação hepática e efeito glicocorticoide na resposta inflamatória aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápia do Nilo, intoxicada por CCl₄**." Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, FCAV- UNESP de Jaboticabal: vii, 57 p, 2014.

MORAES, A. C. et al. Glucocorticoid activity of dexamethasone on cellular response in inflammatory exudate of tilapia, vaccinated and challenged with *Aeromonas hydrophila*. In: **Revista Agropecuária Brasileira**. 2011.

MPA-Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2010.

http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf. Acessado 15 de novembro de 2012.

NACCARI, F et al. Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. **Small Ruminant Research**, 47:1–9,; 2003.

NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, p. 735-738, 1952.

NIZET, V. Streptococcal α -hemolysins: Genetic and Role in Diseases Pathogenesis. **Trends in Microbiology**, n.10, p.575-580, 2002.

NOGA, E.J. The importance of *Lernae* crucita(leSeuer) in the initiation of skin lesions in largemouth bass *Micropterus salmonides* (Lacepede) in the Chowan River, North carolina, **Journal of Fish Diseases**, v.9, p.295-302, 1986.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. *Lemna* sp. GrowthInhibition Test. In: **GUIDELINE for testing of chemicals**, 2002.

OIE – World Organization for Animal Health. OIE list of antimicrobials of veterinary importance (2007). http://web.oie.int/download/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf. Acessado 15 de novembro de 2014.

PATEL, S.S.; BALFOUR, J.A.; BRYSON, H.M. "Fosfomicin tromethamine: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections". **Drugs**, v.53, n.4, p.637–656, 1997.

PICAVET, T. et al. Efficacy of tilmicosin in treatment of pulmonary infections in calves. **Vet Rec**, 129:400–3; 1991.

PILARSKI, F.I.; ROSSINI, A.J.; CECCARELLI, P.S.; Isolamento e caracterização de *Flavobacterium columnare* de quatro espécies de peixes tropicais no Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, n.2, p. 409-414, 2008.

PLUMB, J. A. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, v.328, p.1-64, 1999.

POPOFF, M. III Genus *Aeromonas* Kluyver e van Niel, 1936. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 1 ed. 1 ed. Krieg, NR and Holt, JG pp. P.545–548, 1984.

PRADO, E. J. R. "Insulina e dexametasona na aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Aloxano-diabéticas." Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, FCAV- UNESP de Jaboticabal: xxiv-78, 2014.

QUINTANA, C. F. **Respostas locais e sistêmicas induzidas por endotoxina em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) tratados com cromo**. 67 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2002.

RABOBANK REPORT: Brazil is a seafood industry giant in the making. 12 February 2013. Disponível em: https://www.rabobank.com/en/press/search/2013/Rabobank%20Report_Brazil_is_a_seafood_industry_giant_in_the_making.html?pt=PressReleasepage Acesso em: Setembro de 2014.

RETSEMA J, FU W. Macrolides: structures and microbial targets. International Journal of Antimicrobial Agents. 18: S3-S10. 2001.

SALVADOR, R.; TOAZZA, C.S.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, 98, 235-241. 2012.

SAS Institute Inc. (2001) **SAS/STAT software changes and enhancements through computer program**. Release 8.2. Cary: SAS Institute.

SCORNEAUX, B.; SHRYOCK. T.R.; Intracellular accumulation, subcellular distribution, and afflux of tilmicosin in bovine mammary, blood, and lungcells. **Journal of Dairy Science**. 82 (6): 1202-1212. 1999.

SHELTON, W.L. Tilapia culture in the 21st century. Pages 1-28 in R.D. Guerrero III, editor. **Proceedings of the International Forum on Tilapia Farming in the 21st Century**, Los Baños, Laguna, Philippines, 2002.

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

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, G. **Statistical Methods**. Iowa State University Press. Ames. 1974.

SOLTER, P.F. et al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.10, p.1738-1742, 1991.

SORACI, A.L.; PEREZ, D.S.; MARTINEZ, G.; DIEGUEZ, S.; TAPIA, M.O.; AMANTO, F.; HARKES, R.; ROMANO, O. Disodium-fosfomicin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. **Research in Veterinary Science**, v.90, n.3, p.498-502, 2011.

SURESH, A. V. Tilapia Update. **World Aquaculture**, v.30, n.4, p.8-68. 1998.

TAVARES-DIAS, M; MORAES, F.R. Características hematológicas da Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (*Osteichthyes: cichlidae*) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, p.103-110, 2003.

THOMAS JS. Overview of plasma proteins. In: Feldman, **B.F. Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia:Lippincott, p.891-898. 2000.

TORT, L., Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**,35, 1366-1375. 2011.

TVEDTEN, H., Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 152-161. 2010.

Verlhac, V., Gabaudan, J. **The effect of vitamin C on fish health**. Switzerland: Roche Vitamins, Brochure n° 51002, p.30, 1997.

VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. 2000a. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Review**, 64: 655–671.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic**, v.22, n.5, 1970.

WEIBEL, E.R.; STAUBLI, W.; GNAGI, H.R.; HESS, F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. **Journal of Cell Biology**, p.68-91, 1969.

Wendelaar Bonga, S.E. **The stress response in fish**. Physiological Reviews v.77, p.591-625, 1997.

Won, K.M.; Kim S.M.; Park, S.I. The effects of β -1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **Fish Pathology**, v.17, p.29-38, 2004.

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

ZIMMERMANN, S; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. Páginas 239-266, in J.E.P.Cyrino; E.C. Urbinati; D.M. Fracalossi; N. Castagnolli, editores. **Tópicos Especiais em Piscicultura de água Doce Tropical Intensiva**, Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal , Brasil, SP, 2004.