# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/07/2021.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO PEPTÍDEO LL-37 CONTRA *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA-DO-NILO

**Elielma Lima de Sousa**

**Bióloga**

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO PEPTÍDEO LL-37 CONTRA *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA-DO-NILO

**Discente: Elielma Lima de Sousa**

**Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária**.**

**2020**

S725a

Sousa, Elielma Lima de
Atividade antimicrobiana in vitro e in vivo do peptídeo LL-37 contra Streptococcus agalactiae em tilápia-do-nilo / Elielma Lima de Sousa. -- Jaboticabal, 2020
76 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Fabiana Pilarski

1. Peptídeos. 2. Ação antimicrobiana. 3. Tratamento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**Câmpus de Jaboticabal**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* E *in vivo* DO PEPTÍDEO LL-37 CONTRA *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA-DO-NILO

**AUTORA: ELIELMA LIMA DE SOUSA**
**ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI Fabiana Pilarski
Centro de Aquicultura-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Prof. Dr. JONAS AUGUSTO RIZZATO PASCHOAL P.I Fabiana Pilarski
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP / Ribeirão Preto/SP
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Pós-doutoranda MARITA VEDOVELLI CARDOZO P.I Fabiana Pilarski
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Jaboticabal, 24 de julho de 2020

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Elielma Lima de Sousa – nascida em São Luis, Estado do Maranhão, em 05 de agosto de 1992. Ingressou no Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) em 2011 na Universidade Estadual do Maranhão– Câmpus Paulo VI em São Luis, obtendo o título de bióloga em 2017. Durante a Graduação, realizou graduação sanduiche de um ano e quatro meses (2013-2014) na Universidade de Alberta, Canadá. Ainda como estudante de graduação, realizou outro intercâmbio, desta vez na Argentina. A carreira cientifica como pesquisadora teve início no segundo ano de graduação (2012), quando desenvolveu o primeiro trabalho de Iniciação cientifica (2012-2013) Após a realização deste trabalho, tornou-se bolsista de Incitação cientifica por mais dois anos (2015-2017). Os trabalhos de pesquisa desenvolvidos resultaram em artigos e resumos apresentados e publicados em anais de eventos científicos locais e internacionais. Realizou três estágios extracurriculares. Ingressou no curso de mestrado em março de 2018, no programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Câmpus Jaboticabal).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha existência, por tudo que sou e tenho.

À minha família, especialmente aos meus queridos pais Maria Nivia e Pedro pelo apoio, amor e confiança.

Agradeço a Profa. Dra. Fabiana Pilarski pelo aceite no grupo de pesquisa, por ter acreditado e confiado no meu trabalho. Obrigada pela orientação, paciência e por ajudar na minha formação profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Norival Santos-Filho pelo suporte e disponibilidade de tempo, de muito bom grado em todos os momentos que necessitei.

Aos professores membros da banca examinadora pelo seu tempo e contribuição.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) por toda ajuda, em especial, ao Inácio e Raphael pelo apoio e conhecimento técnico para que este trabalho fosse desenvolvido;

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp.

Aos peixes, que cederam suas vidas para esse projeto.

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

E todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....iv
LISTA DE FIGURAS ..... ...v
Resumo .....vi
Abstract .....vii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 1
1 INTRODUÇÃO ..... 1
2 REVISÃO DE LITERATURA ..... 3
2.1 Piscicultura no Brasil ..... 3
2.2 Estreptococose: um desafio para tilapicultura mundial ..... 4
2.3 Tratamento da estreptococose na piscicultura ..... 6
2.4 Uso de peptídeos como antimicrobiano ..... 7
2.5 Peptídeos Antimicrobianos na Aquicultura ..... 8
2.6 Peptídeo LL-37 ..... 9
2.7 Parâmetros hematológicos e imunológicos em peixes teleósteos ..... 11
3 REFERÊNCIAS ..... 13
CAPITULO 2: Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after treatment using antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*….. ..... 23
Abstract ..... 24
1 Introduction..... 25
2. Material and methods ..... 27
2.1. Antimicrobials ..... 27
2.2.Cytotoxicity studies by haemolytic activity ..... 28
2.3.Antimicrobial susceptibility testing (AST) ..... 29
2.3.1. Bacterial isolates ..... 29
2.3.2. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC)... ..... 29
2.4. *In vivo* therapeutic effectiveness ..... 30
2.4.1. Fish and study design..... 30
2.4.2. Bacterial challenge ..... 32

2.4.2.1. Inoculation of S. agalactiae KU60557.1 ..... 32
2.4.2.2. Antimicrobial administration ..... 32
2.4.3. Effectivenes ..... 33
2.4.3.1. Histological analyses ..... 33
2.5. Blood parameters ..... 34
2.5.1. Hematological analyses ..... 34
2.5.2. Biochemical analyses ..... 35
2.5.3. Immunological analyses ..... 35
2.5.4. Evaluation of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes… ..... ……36
2.6. Statistical analysis ..... 36
3 Results ..... 36
3.1. Hemolytic activity of LL-37 against Nile tilapia red blood cells ..... 36
3.2. In vitro antimicrobial activity ..... 37
3.3. *In vivo* therapeutic effectiveness ..... 33
3.3.1. Histological analyses ..... 40
3.4. Hematological analyses ..... 43
3.5. Biochemical analyses ..... 45
3.6. Immunological analyses ..... 45
3.7. Erythrocytes abnormalities ..... 46
4 Discussion ..... 48
5 Acknowledgement ..... 52
6 References ..... 53

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

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

# CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Atividade *in vitro* e *in vivo* do peptídeo LL-37 contra *Streptococcus agalactiae* em tilápia-do-nilo"**, protocolo nº 011794/19, sob a responsabilidade da Profª Drª Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de setembro de 2019.

| | |
|---|---|
| Vigência do Projeto | 20/09/2019 a 15/02/2020 |
| Espécie / Linhagem | *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) |
| Nº de animais | 204 |
| Peso / Idade | 100 gramas |
| Sexo | Machos |
| Origem | Piscicultura Tuiuiu, SP |

Jaboticabal, 13 de setembro de 2019.

**Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo**
Vice-Coordenador – CEUA

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

# LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 ..... Página

**Table 1.** Histological changes according to the degree of intensity in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* 20 days post-challenge with *Streptococcus agalactiae* and administration of LL-37 or florfenicol (FFC) ..... 42

**Table 2.** Intestinal morphometry of Nile tilapia treated with LL-37 or florfenicol (FFC), at 20$^{th}$ day after challenge with Streptococcus agalactiae..... 43

**Table 3.** Haematological parameters of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* 20 days post-challenge with *Streptococcus agalactiae* and administration of LL-37 or florfenicol (FFC) ..... 44

**Table 4.** Serum biochemical parameters of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* 20 days post-challenge with *Streptococcus agalactiae*, and administration of LL-37 or florfenicol (FFC) ..... 45

**Table 5**. Comparison of micronuclei and other nuclear abnormalities in Nile tilapia 20 days post-challenge with *Streptococcus agalactiae* and administration of LL-37 or florfenicol (FFC) ..... 47

# LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 ..... Página

**Figure 1.** Hemolytic activity of the LL-37 to Nile tilapia red erythrocytes..... 37

**Figure 2.** Cumulative survival (%) of Nile tilapia challenged with *S. agalactiae* and medicated with LL-37 or florfenicol (FFC)..... 38

**Figure 3.** Typical signs of streptoccosis in fish dying during the experimental period ..... 39

**Figure 4.** Changes in tissue section of Nile tilápia ..... 40

**Figure 5.** Mean of Leukocyte respiratory burst, Serum lysozyme concentration and Hemolytic activity of the alternative pathway of the complement system of surviving *O. niloticus* in 20$^{th}$ day post treatment with LL-37 peptide ..... 46

**Figure 6.** Photomicrographs of erythrocytes with normal nucleus, Micronuclei and nuclear abnormalities in peripheral blood cells of Nile tilapia ..... 47

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO PEPTÍDEO LL-37 CONTRA *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIA-DO-NILO**

**RESUMO -** A estreptococose é uma doença bacteriana que causa grandes perdas econômicas na produção de tilápia. O *Streptococcus agalactiae* é um dos principais patógenos causadores de infecção em tilápia, em várias regiões do mundo. Atualmente, no caso de infecções microbianas em peixes, existem apenas duas moléculas licenciadas para uso na aquicultura. Os peptídeos com potencial antimicrobiano são compostos promissores no desenvolvimento de uma nova classe de antimicrobianos. O peptídeo LL-37, uma catelicidina humana caracterizada como um antibiótico de amplo espectro possui propriedades quimiotáticas e imunomoduladoras, as quais inibem a colonização de patógenos. Desta forma, neste trabalho objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana do peptídeo LL-37 em tilápia-do-Nilo infectadas com *S. agalactiae.* Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do LL-37 para *S. agalactiae*. Adicionalmente, avaliou-se a atividade hemolítica desse peptídeo e sua eficácia no tratamento da estreptococose em tilápia-do-Nilo. Os resultados demonstrados neste estudo mostraram que a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima do LL-37 para *S. agalactiae* foi 31,25 µg/mL. Os parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos apresentaram valores sem diferenças significativas entre os grupos. Nossos resultados sugerem que o peptídeo LL-37 é um potente antimicrobiano contra *S. agalactiae in vitro* e não afeta a viabilidade celular dos peixes. Não foi possível, com a dose 15 mg/kg controlar a mortalidade da tilápias infectadas com a bactéria, contudo, foi possível eliminar o patógeno dos peixes sobreviventes, o que pode ser positivo no controle de estreptococose recorrente.

**Palavras-chave:** peptídeo, ação antimicrobiana, tratamento

# ANTIMICROBIAL ACTIVITY *IN VITRO* AND *IN VIVO* OF LL-37 PEPTIDE AGAINST *Streptococcus agalactiae* IN NILE TILAPIA

**ABSTRACT -** Streptococcosis is a bacterial disease. It causes elevate economic savings in tilapia production. *Streptococcus agalactiae* is a pathogen wich cause motality of red tilapia in many regions of the world. Currently, microbial infections in fish are treated only with two molecules which one are licensed for use in aquaculture. Peptides with antimicrobial potential are promising compounds in the development of a new class of antimicrobials. LL-37 peptide has broad spectrum bacterial activity. In the present study, we aimed to evaluate antimicrobial activity of peptide LL37 in Nile tilapia infected with *S. agalactiae*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the concentration bacterial resistance (CBR) from LL-37 to *S. agalactiae* were analyzed. Additionally, hemolytic activity of this peptide was tested. As well, we evaluated efficacy of LL-37 in the treatment of streptococcosis in Nile tilapia. As the results, the minimum inhibitory concentration and the minimum bacterial concentration of LL-37 for *S. agalactiae* were 31.25 µg/mL. LL-37 in the treatment of infectious diseases by *S. agalactiae* was not effective at the dose of 15 mg/kg. Hematological, biochemical and immunological parameters include values within the range for healthy fish. Changes in blood cells and tissue of brain, kidney, liver and splen were found. Our results suggest LL-37 is a potent antimicrobial against *S. agalactia* in vitro and it does not affect fish cell viability. We conclude, It was not possible to control the mortality of streptococcosis with the dose of 15 mg/kg of LL-37, however, it eliminated either pathogen in surviving fish.
**Keywords:** peptide, antimicrobials, treatment

# CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

## 1 INTRODUÇÃO

A ausência de um manejo adequado nos viveiros e tanques-rede utilizados nos diferentes sistemas de produção pode levar a deterioração da qualidade da água, com consequências para todo o sistema aquático e também para a criação de organismos aquáticos (Meneghine, 2013).

Assim, faz se necessário o monitoramento dessa atividade, sobretudo nos lugares onde há rápida expansão e concentrada densidade de organismos nestes sistemas de criação (Dias e Sipaúba-Tavares, 2012).

Alterações físicas e químicas do meio aquático são críticas para desenvolvimento de doenças parasitárias e bacterianas em peixes. A combinação de um patógeno presente na água, um hospedeiro suscetível e um ambiente com baixa qualidade define a patogênese de muitas doenças infecciosas em peixes (Plumb e Hanson, 2011).

Nos últimos anos, a criação de tilápia tem sido prejudicada economicamente por elevada taxa de mortalidade decorrente principalmente de doenças bacterianas, e dentre elas, destaca-se a estreptococose. De acordo com Figueiredo et al. (2006), infecções causadas por *Streptococcus* spp. aumentaram nos últimos anos por elevação na ocorrência de casos clínicos, principalmente, associados a *Streptococcus agalactiae (S. agalactiae)* com perdas na tilapicultura mundial.

A bactéria *S. agalactiae* além das mortalidades que provoca, também apresenta potencial de infectar mamíferos, humanos e aves, constituindo-se em um risco para a saúde pública. Em neonatos humanos, o *S. agalactiae* é o principal agente etiológico de septicemia, com evolução para outros quadros clínicos graves (Domelier et al., 2008).

Atualmente, no caso de infecções microbianas em peixes, existe apenas dois antimicrobianos licenciados para uso na aquicultura, o florfenicol (específico para o tratamento da estreptococose) e a oxitetraciclina. A ineficácia desses medicamentos

pode levar ao uso irregular de outros antimicrobianos e aplicação de elevadas doses favorecendo a resistência bacteriana, o que pode gerar impacto ambiental e acúmulo de resíduos no produto destinado ao consumo humano (Hölmstrom et al., 2003).

A resistência de patógenos aos antimicrobianos licenciados tem se tornado um problema mundial de interesse na produção aquícola. Vários microrganismos multirresistentes vêm surgindo atualmente e, em sua grande parte, são bactérias causadoras de infecções em peixes (Costa et al., 2008; Amarante et al., 2018).

A presença de bactérias resistentes aumenta tanto a mortalidade como também o custo do tratamento, a evolução do quadro infeccioso e a duração da doença (Fernandes et al., 2014). Para solucionar essa problemática, diversas estratégias vêm emergindo. Uma delas é através de estudos com peptídeos antimicrobianos (PAMs), os quais são componentes do sistema imune de vertebrados e invertebrados e a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos (Brogden, 2005; Brown e Hancock, 2006).

Os PAMs podem ser utilizados em combinação ou não com outros fármacos e são compostos promissores no desenvolvimento de uma nova classe de antimicrobianos, pois apresentam características como a capacidade de eliminar bactérias Gram positivas e negativas, e atividade contra patógenos já multirresistentes aos fármacos comerciais (Da Silva et al., 2013; Krelin et al., 2016; Santos-Filho et al., 2017).

Os PAMs possuem atividade antimicrobiana já comprovada contra diversos patógenos (Kim et al., 2002; Rahnamaeian, 2011; Bahar e Ren, 2013  Santos-Filho et al., 2017; Kim et al., 2017; Liu et al., 2018). O tratamento com peptídeos se torna uma alternativa ao uso de antimicrobianos, representando uma possibilidade interessante no controle de surtos de doenças.

Entre os peptídeos mais utilizados em estudos científicos destaca-se o peptídeo LL-37, um peptídeo catiônico pertecente a família das catelicinas e presente nos humanos, com amplo espectro de ação, predominantemente encontrado e secretado em vários tecidos e fluidos (De Smet e Contreras, 2005; Cederlund et al., 2011). E é um peptídeo com capacidade de neutralizar a parede das bactérias (LPS) e interromper o seu crescimento (Cederlund et al., 2011).

Por ser um peptídeo com atividade antimicrobiana promissora (Mookherjee e Hancock, 2007; Overhage et al., 2008; Molhoek et al., 2009; Hell et al., 2010, Kanthawong et al., 2010; Thennarasu et al., 2010; Kanthawong et al., 2012) o LL-37 foi selecionado para ser usado neste trabalho, uma vez que não foram encontradas informações na literatura sobre o seu uso no tratamento de infecções causadas por *S. agalactiae* em tilápia-do-nilo.

Desta forma, neste estudo objetivo-se avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do peptídeo LL-37 em tilápia-do-Nilo infectadas com *S. agalactiae*; a atividade citotóxica do peptídeo nas células sanguíneas e alerações nos parâmetros hematológicos, imunológicos e bioquimicos de juvenis de tilápia.

In conclusion, this study indicates that LL-37 is a promising antimicrobial candidate in the fight against bacterial diseases in aquaculture, since it showed strong *in vitro* antimicrobial activity against the most important and devastating pathogens of Nile tilapia and no significant effects on the haematological, biochemical and immunological parameters of the host, following a single oral dose of 15 mg/kg.

## 5 Acknowledgement

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) [grant numbers 88882.433649/2019-01, 88882.433845/2019-01] and students from the Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms (LAPOA) of Caunesp for technical support.

## 6 References

Andersson, M., 2019. Staphylococcus epidermidis Persister Cell Elimination Using an Antimicrobial Peptide. J. Bacteriol. Mycol. 6, 2–7. https://doi.org/10.26420/jbacteriolmycol.2019.1093

Asencios, Y.O., Sánchez, F.B., Mendizábal, H.B., Pusari, K.H., Alfonso, H.O., Sayán, A.M., Figueiredo, M.A.P., Manrique, W.G., Belo, M.A. de A., Chaupe, N.S., 2016. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. Aquac. Reports 4, 74–79.

https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.06.002

Assane, I.M., Gozi, K.S., Valladão, G.M.R., Pilarski, F., 2019. Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use of thiamphenicol/florfenicol against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 507, 238–245. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.021

Assefa, A., Abunna, F., 2018. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. Vet. Med. Int. https://doi.org/10.1155/2018/5432497

Azevedo, T.M.P. de, Martins, M.L., Yamashita, M.M., Francisco, C.J., 2006. Hematologia de Oreochromis niloticus: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do Rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. B. Inst. Pesca 32, 41–49. https://doi.org/10.4013/ete.2009.51.02

Barksdale, S.M., Hrifko, E.J., Chung, E.M.C., Van Hoek, M.L., 2016. Peptides from American alligator plasma are antimicrobial against multi-drug resistant bacterial pathogens including *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol. 16, 1–14. https://doi.org/10.1186/s12866-016-0799-z

Beaudoin, T., Stone, T.A., Glibowicka, M., Adams, C., Yau, Y., Ahmadi, S., Bear, C.E., Grasemann, H., Waters, V., Deber, C.M., 2018. Activity of a novel antimicrobial peptide against Pseudomonas aeruginosa biofilms. Sci. Rep. 8, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33016-7

Biller-Takahashi, J., Takahashi, L., Saita, M., Gimbo, R., Urbinati, E., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. Brazilian J. Biol. 73, 425–429. https://doi.org/10.1590/s1519-69842013000200026

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. Nat. Rev. Microbiol. 14, 320–330. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34

Bridle, A., Nosworthy, E., Polinski, M., Nowak, B., 2011. Evidence of an antimicrobial-immunomodulatory role of atlantic salmon cathelicidins during infection with yersinia ruckeri. PLoS One 6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023417

Brum, A., Cardoso, L., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2018. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture 490, 98–107. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.040

Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Buschmann, A.H., Dölz, H.J., 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. Lancet Infect. Dis. 16, e127–e133. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00100-6

Caiaffa, K.S., Basso, F.G., Santos-Filho, N.A., de Souza-Costa, C.A., Sakai, V.T., Cilli, E.M., Duque, C., 2019. Effect of analogues of cationic peptides on dentin mineralization markers in odontoblast-like cells. Arch. Oral Biol. 103, 19–25. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.05.006

Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47, 2123–2136. https://doi.org/10.1139/f90-237

Chen, X., Zhang, M., Zhou, C., Kallenbach, N.R., Ren, D., 2011. Control of bacterial persister cells by Trp/Arg-containing antimicrobial peptides. Appl. Environ. Microbiol. 77, 4878–4885. https://doi.org/10.1128/AEM.02440-10

Chettri, J.K., Mehrdana, F., Hansen, E.B., Ebbensgaard, A., Overgaard, M.T., Lauritsen,

A.H., Dalsgaard, I., Buchmann, K., 2017. Antimicrobial peptide CAP18 and its effect on *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum): comparing administration by injection and oral routes. J. Fish Dis. 40, 97–104. https://doi.org/10.1111/jfd.12497

Chia, T.J., Wu, Y.C., Chen, J.Y., Chi, S.C., 2010. Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. Fish Shellfish Immunol. 28, 434–439. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.020

Chideroli, R.T., Amoroso, N., Mainardi, R.M., Suphoronski, S.A., de Padua, S.B., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., Mosela, M., Moralez, A.T.P., de Oliveira, A.G., Zanolo, R., Di Santis, G.W., Pereira, U.P., 2017. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. Aquaculture 479, 45–51. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.013

Ciornei, C.D., Sigurdardóttir, T., Schmidtchen, A., Bodelsson, M., 2005. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 2845–2850. https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2845-2850.2005

CLSI, 2014. Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Approved Guideline — Second Edition. CLSI Doc. VET04-A2.

Collier, H.B., 1944. Standardization of Blood Haemoglobin Determinations. Can. Med. Assoc. J. 50, 550–552.

Consuegra, J., Elena de Lima, M., Santos, D., Sinisterra, R.D., Cortés, M.E., 2013. Peptides: β-Cyclodextrin Inclusion Compounds as Highly Effective Antimicrobial and Anti-Epithelial Proliferation Agents. J. Periodontol. 84, 1858–1868. https://doi.org/10.1902/jop.2013.120679

de Oliveira, T.F., Queiroz, G.A., Teixeira, J.P., Figueiredo, H.C.P., Leal, C.A.G., 2018. Recurrent *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with florfenicol. Aquaculture 493, 51–60. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.037

Demers, N.E., Bayne, C.J., 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Dev. Comp. Immunol. 21, 363–373. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(97)00009-8

Fabisiak, A., Murawska, N., Fichna, J., 2016. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. Pharmacol. Reports 68, 802–808. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.015

Faria, F.C., Leal, C.A.G., Carvalho-Castro, G.A., Leite, R.C., Figueiredo, H.C.P., 2014. Carrier state induced by oxytetracycline therapy against streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J. Fish Dis. 37, 853–857. https://doi.org/10.1111/jfd.12177

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., 2003. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 534, 65–75. https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00249-8

Filho, C.I., Müller, E.E., Pretto-giordano, L.G., Bracarense, A.P.F.R.L., 2009. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). Brazilian J. Vet. Pathol. 2, 12–15.

Giguère, S., Prescott, J.F., Dowling, P.M., 2013. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Fifth. ed, John Wiley & Sons, Inc. Wiley Blackwell. https://doi.org/10.1002/9781118675014

Gundersen, H.J.G., 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary

profiles : the edge effect. J. Microsc. 111, 219–223. https://doi.org/10.1039/AN9244900130

Hesser, E.F., 1960. Methods for Routine Fish Hematology. Progress. Fish-Culturist 22, 164–171. https://doi.org/10.1577/1548-8659(1960)22

Hisano, H., Barros, M.M., Pezzato, L.E., 2007. Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos *. B. Inst. Pesca 33, 35–42.

Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis* Hybrid). Vet. Clin. Pathol. 29, 7–12. https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2000.tb00389.x

Jeney, G., Anderson, D.P., 1993. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. Fish Shellfish Immunol. 3, 51–58.

Ji, S., Hyun, J., Park, E., Lee, B.L., Kim, K.K., Choi, Y., 2007. Susceptibility of various oral bacteria to antimicrobial peptides and to phagocytosis by neutrophils. J. Periodontal Res. 42, 410–419. https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00962.x

Johansson, J., Gudmundsson, G.H., Rottenberg, M.E., Berndt, K.D., Agerberth, B., 1998. Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37*. J. Biol. Chem. 273, 3718–3724. https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3718

Jørgensen, J.B., Robertsen, B., 1995. Yeast β-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. Dev. Comp. Immunol. 19, 43–57. https://doi.org/10.1016/0145-305X(94)00045-H

Kaiser, E.T., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I., 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Anal. Biochem. 34,

595–598. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6

Kreling, P.F., Aida, K.L., Massunari, L., Caiaffa, K.S., Percinoto, C., Bedran, T.B.L., Spolidorio, D.M.P., Abuna, G.F., Cilli, E.M., Duque, C., 2016. Cytotoxicity and the effect of cationic peptide fragments against cariogenic bacteria under planktonic and biofilm conditions. Biofouling 32, 995–1006. https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1218850

Labtest, 2014a. Proteínas totais: Instruções de uso. Labtest Diagnóstica S.A.

Labtest, 2014b. AST/GOT Liquiform 1–6.

Labtest, 2013. Albumina: Instruções de uso. Labtest Diagnóstica S.A.

Labtest, 2012. ALT / GPT Liquiform Vet 1–6.

Lulijwa, R., Rupia, E.J., Alfaro, A.C., 2019. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. Rev. Aquac. 12, 640–663. https://doi.org/10.1111/raq.12344

Masso-Silva, J.A., Diamond, G., 2014. Antimicrobial peptides from fish. Pharmaceuticals 7, 265–310. https://doi.org/10.3390/ph7030265

Merrifield, R.B., 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2154. https://doi.org/10.1021/ja00897a025

Mwangi, J., Yin, Y., Wang, G., Yang, M., Li, Y., Zhang, Z., Lai, R., 2019. The antimicrobial peptide ZY4 combats multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 26516–26522. https://doi.org/10.1073/pnas.1909585117

Nagaoka, I., Tamura, H., Hirata, M., 2006. An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X 7 . J. Immunol. 176, 3044–3052.

https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3044

Nagata, M.M., Zanuzzo, F.S., Saita, M.V., Biller, J. da B., Urbinati, E.C., Takahashi, L.S., 2009. Efeito da perseguição e exposição aérea nos parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia-do-Nilo., in: V Simpósio de Ciências Da UNESP e VI Encontro de Zootecnia. Dracena.

Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Shiba, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Sayama, K., Hashimoto, K., Kurihara, H., Sugai, M., 2005. Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. J. Antimicrob. Chemother. 55, 888–896. https://doi.org/10.1093/jac/dki103

Pan, C.Y., Huang, T.C., Wang, Y. Da, Yeh, Y.C., Hui, C.F., Chen, J.Y., 2012. Oral administration of recombinant epinecidin-1 protected grouper (*Epinephelus coioides*) and zebrafish (*Danio rerio*) from *Vibrio vulnificus* infection and enhanced immune-related gene expressions. Fish Shellfish Immunol. 32, 947–957. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.023

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Sublethal Chronic Eff. Pollut. Freshw. Fish 339–352.

Ranzani-Paiva, M.J.T., De Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para Análise Hematológica em Peixes. Maringá.

Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Markes, E.K., 2003. Mutagênese Ambiental. ULBRA (2003).

Ringø, E., Zhou, Z., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S., Romero, J., Krogdahl, Olsen, R.E., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Owen, M., Lauzon, H.L., Martinsen, L.L., De

Schryver, P., Bossier, P., Sperstad, S., Merrifield, D.L., 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? Aquac. Nutr. 22, 219–282. https://doi.org/10.1111/anu.12346

Rivas-Santiago, B., Rivas Santiago, C.E., Castañeda-Delgado, J.E., León-Contreras, J.C., Hancock, R.E.W., Hernandez-Pando, R., 2013. Activity of LL-37, CRAMP and antimicrobial peptide-derived compounds E2, E6 and CP26 against *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Antimicrob. Agents 41, 143–148. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.015

Santos-Filho, N.A., Lorenzon, E.N., Ramos, M.A.S., Santos, C.T., Piccoli, J.P., Bauab, T.M., Fusco-Almeida, A.M., Cilli, E.M., 2015. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. Toxicon 103, 160–168. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.004

Scheenstra, M.R., van den Belt, M., Tjeerdsma-van Bokhoven, J.L.M., Schneider, V.A.F., Ordonez, S.R., van Dijk, A., Veldhuizen, E.J.A., Haagsman, H.P., 2019. Cathelicidins PMAP-36, LL-37 and CATH-2 are similar peptides with different modes of action. Sci. Rep. 9, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41246-6

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Hönnen, W., Triebskorn, R., 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover. 6, 75–86. https://doi.org/10.1023/A:1008212000208

Sigurdardottir, T., Andersson, P., Davoudi, M., Malmsten, M., Schmidtchen, A., Bodelsson, M., 2006. In silico identification and biological evaluation of antimicrobial peptides based on human cathelicidin LL-37. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 2983–2989. https://doi.org/10.1128/AAC.01583-05

Soto, E., Wang, R., Wiles, J., Green, C., Plumb, J., Hawke, J., Soto, E., 2015.

Characterization of isolates of *Streptococcus agalactiae* from diseased farmed and wild marine fish from the U.S. Gulf coast, Latin America, and Thailand. J. Aquat. Anim. Health 27, 123–134. https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1032439

Soto, E., Zayas, M., Tobar, J., Illanes, O., Yount, S., Francis, S., Dennis, M.M., 2016. Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with Streptococcus agalactiae: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. J. Comp. Pathol. 155, 339–345. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.09.003

Stroband, H.W.J., Debets, F.M.H., 1978. The ultrastructure and renewal of the intestinal epithelium of the juvenile grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). Cell Tissue Res. 187, 181–200. https://doi.org/10.1007/BF00224364

Subasinghe, R.P., Bueno, P.B., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E., Arthur, J.R., 2000. Aquaculture in the third millennium, in: Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium. FAO, Bangkok, pp. 20–25.

Tavares-Dias, M., Faustino, C.D., 1998. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. Ars Vet. 14, 254–263.

Tavares-Dias, M., Martins, M.L., Moraes, F.R., Kronka, N., 2000. Condition factor, hepatosomatic and splenosomatic relation of freshwater fishes naturally parasitized. Acta Sci. Biol. Sci. 22, 533–537.

Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.N., Waring, A.J., Lehrer, R.I., 1998. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 2206–2214. https://doi.org/10.1128/aac.42.9.2206

Valero, Y., Saraiva-Fraga, M., Costas, B., Guardiola, F.A., 2018. Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. Rev. Aquac. 1–30.

https://doi.org/10.1111/raq.12314

Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Kotzent, S., Assane, I.M., Pilarski, F., 2019. Effects of dietary thyme essential oil on hemato-immunological indices, intestinal morphology, and microbiota of Nile tilapia. Aquac. Int. 27, 399–411. https://doi.org/10.1007/s10499-018-0332-5

Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., Schoofs, L., 2012. A comprehensive summary of LL-37, the factoctum human cathelicidin peptide. Cell. Immunol. 280, 22–35. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.009

Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. Folia Haematol. 31, 32–49.

Yeaman, M.R., Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. Pharmacol. Rev. 57, 27–55. https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2.27

Zanuzzo, F.S., Sabioni, R.E., Montoya, L.N.F., Favero, G., Urbinati, E.C., 2017. Aloe vera enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. Fish Shellfish Immunol. 65, 198–205. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.013

Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415, 389–395. https://doi.org/10.4324/9781351302289-5

Zsila, F., Beke-Somfai, T., 2020. Human host-defense peptide LL-37 targets stealth siderophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.162