

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO IMUNOFARMACOLÓGICA DA
DOXICICLINA, ADMINISTRADA VIA ORAL EM TILÁPIAS
DO NILO, *Oreochromis niloticus*, DESAFIADAS COM
Streptococcus agalactiae E *Aeromonas hydrophila***

Susana Luporini de Oliveira
Médica Veterinária

Jaboticabal/SP
Julho/2022

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

**AVALIAÇÃO IMUNOFARMACOLÓGICA DA
DOXICICLINA, ADMINISTRADA VIA ORAL EM TILÁPIAS
DO NILO, *Oreochromis niloticus*, DESAFIADAS COM
Streptococcus agalactiae E *Aeromonas hydrophila***

Susana Luporini de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva

**Jaboticabal/SP
Julho/2022**

O48a Oliveira, Susana Luporini de
Avaliação imunofarmacológica da doxiciclina, administrada via oral em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Desafiadas com *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* / Susana Luporini de Oliveira. -- Jaboticabal, 2022
102 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Hélio José Montassier

1. Tetraciclina. 2. Tilápia do Nilo. 3. Ciclídeos. 4. Estreptococose. 5. Aeromonose. 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.

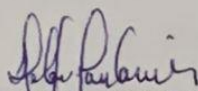
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO IMUNOFARMACOLÓGICA DA DOXICICLINA, ADMINISTRADA VIA ORAL EM TILÁPIAS DO NILO, *Oreochromis niloticus*, DESAFIADAS COM *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*

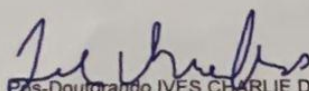
AUTORA: SUSANA LUPORINI DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

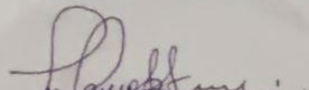
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal



Pós-Doutorando IVES CHARLIE DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Farmacologia da Universidade de São Paulo- ICB/USP / São Paulo/SP



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 25 de julho de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Susana Luporini de Oliveira - nascida em 13 de novembro de 1996, na cidade de São Carlos- SP. Formação em Medicina Veterinária pela Universidade Brasil em 2020. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil (Processo: 2016/23103-8) durante 3 anos. Foi Estagiária do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal (2016-2019), além de colaboradora no desenvolvimento de projetos do Grupo de pesquisas (GAP) na área de fisiopatologia do processo inflamatório em peixes teleósteos. Atualmente é Mestranda na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus Jaboticabal (FCAV) no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e bolsista Capes (Processo: 88887.512465/2020-00).

“Todos os nossos sonhos podem se tornar realidade,
se tivermos a coragem de persegui-los”

Walt Disney

Dedico este trabalho aos meus pais, irmã,
amigos e a todos os que sempre me
ampararam e fizeram parte dessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e Nossa Senhora Aparecida por sempre estarem presentes em minha vida, iluminando e guiando meu caminho, protegendo e dando-me forças a cada dia para enfrentar todos os obstáculos.

A toda minha família, em especial a meus pais, Ismail e Cidinha e à minha irmã Bianca, que sempre acreditaram em mim, me apoiando, aconselhando e incentivando a prosseguir e, acima de tudo pela compreensão, agradeço a vocês e serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim.

Agradeço ao meu orientador, Professor Hélio Montassier, por todo apoio, amparo, ajuda e disponibilidade. Obrigada por contribuir com meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por toda confiança e paciência, estando prontamente disposto a me ajudar sempre que precisei. Obrigada por me amparar, abrindo as portas da pós-graduação e desta forma tornando esse processo realidade.

Agradeço ao meu amigo e professor Marco Belo. Obrigada por abrir minha mente e mostrar-me o quão longe posso chegar. Obrigada pelo apoio e orientações nos momentos difíceis. Obrigada pelos incansáveis “puxões de orelha” ao longo do meu desenvolvimento profissional. Espero um dia poder deixá-lo muito orgulhoso com minhas conquistas futuras.

Aos professores e funcionários da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp/FCAV) e do Instituto Butantan (SP), gostaria de deixar meu eterno agradecimento pela paciência, pela partilha de conhecimento, pelos ensinamentos para a vida.

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

É muito gratificante pensar que temos pessoas incríveis na nossa vida que estão sempre lá, dispostas a nos ajudar, nos aconselhar e que querem nos ver bem a qualquer custo, por isso gostaria de agradecer aos meus amigos e parceiros de laboratório Camila, Mayumi, Leticia, Gabriel e Romário, que em tão pouco tempo se tornaram pessoas muito especiais para mim. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, pelo apoio, ajuda, paciência e incentivo. Obrigada pelo companheirismo, amparo, conversas, risadas e distrações. Sou grata a Deus por ter colocado pessoas como vocês em meu caminho.

E por fim, gostaria de agradecer a duas pessoas muito especiais, que considero irmãozinhos que a faculdade me presenteou, Isabela e Natan. Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer vocês com o devido merecimento. A ajuda, apoio, paciência, carinho e amparo de vocês desde o primeiro dia de faculdade, durante

toda essa trajetória, para mim possui um valor inestimável. Apenas posso me expressar através da limitação de meras palavras, e com elas lhes prestar esta humilde, mas sincera, homenagem. Com todo carinho do mundo, MUITO OBRIGADA! Mesmo que distantes, seguindo caminhos diferentes, levarei para sempre vocês em meu coração.

A quem não mencionei, mas que de alguma forma fizeram parte do meu percurso eu agradeço com todo meu coração.

Sumário

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Qualificação do problema a ser abordado	2
2.2. Doxiciclina	3
2.3. Tilapicultura.....	4
2.4. <i>Streptococcus agalactiae</i>	6
2.5. <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
3. OBJETIVOS.....	7
3.1. Objetivos gerais	7
3.2. Objetivos específicos.....	8
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	8
CAPÍTULO 2 – Avaliação da segurança clínica de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) tratadas via oral com Doxiciclina	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Peixes e acondicionamento.....	16
2.2. Delineamento experimental.....	17
2.3. Dieta experimental.....	17

2.4.	Anestesia dos peixes.....	18
2.5.	Coleta de sangue e análise hematológica	18
2.6.	Avaliação bioquímica sérica.....	19
2.7.	Avaliação morfométrica e histopatológica dos órgãos.....	19
2.8.	Análise estatística	19
3.	RESULTADOS	20
3.1.	Análise de parâmetros bioquímicos séricos.....	20
3.2.	Análise hematológica	23
3.3.	Análise morfométrica de órgãos.....	26
3.4.	Alterações histopatológicas	27
4.	DISCUSSÃO.....	27
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 3 – Avaliação da eficácia terapêutica da Doxiciclina em tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) tratadas via oral		34
1.	INTRODUÇÃO	35
2.	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1.	Peixes e acondicionamento.....	36
2.2.	Design experimental	37
2.3.	Dieta experimental.....	38
2.4.	Anestesia dos peixes.....	39
2.5.	Produção dos inóculos de <i>A. hydrophila</i> e <i>S. agalactiae</i>	39
2.5.1.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	39
2.5.2.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	40
2.6.	Determinação da concentração bacteriana letal (DL50).....	40
2.6.1.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	40
2.6.2.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	41

2.7.	Infecção experimental.....	41
2.8.	Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC).....	41
2.9.	Teste de sensibilidade à doxiciclina (Disco de difusão).....	42
2.9.1.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	42
2.9.2.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	43
2.10.	Avaliação clínica e comportamental	43
2.11.	Avaliação hematológica.....	43
2.12.	Avaliação histopatológica dos órgãos.....	44
2.13.	Reisolamento dos patógenos.....	44
2.14.	Determinação da concentração de anticorpos por método de Elisa indireto	45
2.15.	Análise estatística	46
3.	RESULTADOS.....	46
3.1.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	46
3.1.1.	Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC)	46
3.1.2.	Teste antibiograma.....	46
3.1.3.	Avaliação clínica e comportamental	47
3.1.4.	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.....	47
3.1.5.	Análise hematológica.....	48
3.1.6.	Burst respiratório leucocitário.....	50
3.1.7.	Mensuração de anticorpos por métodos Elisa indireto	51
3.1.8.	Alterações histopatológicas	52
3.2.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	54
3.2.1.	Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC)	54
3.2.2.	Teste de sensibilidade à doxiciclina.....	54
3.2.3.	Avaliação clínica e comportamental	54
3.2.4.	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.....	54

3.2.5.	Análise hematológica.....	56
3.2.6.	Burst respiratório leucocitário.....	58
3.2.7.	Mensuração de anticorpos por métodos Elisa indireto	58
3.2.8.	Alterações histopatológicas	59
4.	DISCUSSÃO.....	61
4.1.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	61
4.2.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	62
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	65
CAPÍTULO 4 – Avaliação ecotoxicológica da Doxiciclina em organismos de diferentes níveis tróficos das cadeias biológicas aquáticas		71
1.	INTRODUÇÃO	72
2.	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1.	Ensaio de toxicidade aguda para as plantas <i>Lemna minor</i> , <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Wolffia brasiliensis</i>	73
2.2.	Ensaio de toxicidade aguda para <i>Hyphessobrycon eques</i> , <i>Pomacea canaliculata</i> e <i>Macrobrachium acanthurus</i>	75
2.3.	Avaliação do risco de intoxicação ambiental	76
3.	RESULTADOS	76
4.	DISCUSSÃO.....	77
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
CAPÍTULO 5 – Considerações finais		80

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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



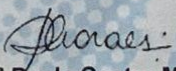
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"AVALIAÇÃO IMUNOFARMACOLÓGICA DA DOXICICLINA, ADMINISTRADA VIA ORAL EM TILÁPIAS DO NILO, *Oreochromis niloticus*, DESAFIADAS COM *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*"**, protocolo nº 5315/20, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hélio José Montassier, 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 10 de dezembro de 2020.

Vigência do Projeto	15/12/2020 a 30/06/2022
Espécie / Linhagem	<i>Oreochromis niloticus</i> / Tilápia do Nilo
Nº de animais	365
Peso / Idade	100g
Sexo	Macho
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 18 de maio de 2022.


Profª Drª Paola Castro Moraes
Vice-Coordenadora – CEUA

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

**AVALIAÇÃO IMUNOFARMACOLÓGICA DA DOXICICLINA, ADMINISTRADA
VIA ORAL, PARA O TRATAMENTO DE *Streptococcus agalactiae* E *Aeromonas
hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO, *Oreochromis niloticus***

RESUMO – O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial imunofarmacológico da doxiciclina, administrada via oral, em tilápias do Nilo, *O. niloticus*, através dos estudos de: eficácia terapêutica, segurança clínica e ecotoxicológica. **1) Segurança clínica:** foram utilizadas 75 tilápias no Nilo (± 300 g) oriundas da mesma desova, acondicionadas em 15 tanques (100L), sendo constituído os seguintes tratamentos: T0 (não tratado com Doxiciclina); T1, T2, T3 e T4 (tratados com 10, 20, 40 e 80mg/kg de p.v. de Doxiciclina, respectivamente), em que 5 animais foram amostrados por tratamento em 3 períodos: 2, 4 e 8 dias, para colheita de amostras de sangue para determinação do hemograma e bioquímico, além de órgãos como baço, fígado e rins (cranial e caudal) para avaliação somática e histopatológica. **2) Eficácia terapêutica:** foram delineados dois ensaios experimentais: 130 tilápias do Nilo (± 100 g) para *A. hydrophila* e 130 tilápias para *S. agalactiae*, acondicionadas em 26 tanques de 100L (n=10), sendo constituído os seguintes tratamentos: A0/S0 (controle, infecção e não tratado com Doxiciclina); A1/S1, A2/S2, A3/S3 e A4/S4 (infecção e tratados com 20, 40 e 80mg/kg de p.v. de Doxiciclina, respectivamente), bem como 10 animais para cada ensaio experimental para constituir os valores de referência (sem tratamento e sem infecção). Animais que sobreviveram ao estímulo infeccioso foram amostrados no 11º dia de infecção e 4 dias após o término do tratamento (15º dia) para avaliação de recuperação clínica e microbiológica. Foi coletado sangue para hemograma, leucograma, burst e mensuração de anticorpos anti-*S. agalactiae* e anti-*A. hydrophila*. Amostras de baço, fígado e rim cranial para avaliação histopatológica, além de cérebro e rim caudal para estudo microbiológico de reisolamento dos patógenos. **3) Avaliação Ecotoxicológica:** Foram delineados seis ensaios ecotoxicológicos e determinação de CL50 em peixes (*Hyphessobrycon eques*), plantas aquáticas (*Lemna minor*, *Azolla carolinia* e *Wolffia brasiliensis*), crustáceos (*Macrobrachium acanthurus*) e moluscos (*Pomacea canaliculata*). **Resultados:** Os resultados do estudo de segurança clínica demonstraram alterações clínicas transitórias em peixes tratados durante oito dias consecutivos com a dose de 80mg/Kg de p.v., os quais apresentaram aumento de atividade enzimática de aspartato aminotransferase e diminuição dos valores circulantes de hemoglobina. Os estudos de eficácia terapêutica revelaram efeito dose-resposta para o controle da infecção experimental aos estímulos de DL50 para *S. agalactiae* e *A. hydrophila*, bem como na produção de anticorpos anti-*S. agalactiae* e anti-*A. hydrophila*, respectivamente, confirmando a hipótese de que a ação antimicrobiana da doxiciclina auxiliou os mecanismos de defesa das tilápias tratadas em ambos os estudos quando comparadas aos animais controles não tratados. O antimicrobiano doxiciclina foi classificado como moderadamente tóxico para o organismo teste *W. brasiliensis* e praticamente não tóxico para os demais organismos testes. **Conclusão:** A avaliação imunofarmacológica da doxiciclina em tilápias revelou, no conjunto, o potencial deste antimicrobiano para uso na tilapicultura, por apresentar eficácia terapêutica no controle de patógenos com significativa importância sanitária e econômica (*S. agalactiae* e *A. hydrophila*), principalmente na dose de 40 e 80mg, além de apresentar boa margem de segurança clínica e ambiental.

Palavras-chave: tetraciclina, tilápias do Nilo, ciclídeos, estreptococose, aeromonose.

IMMUNOPHARMACOLOGICAL EVALUATION OF ORALLY ADMINISTERED DOXYCYCLINE FOR THE TREATMENT OF *Streptococcus agalactiae* AND *Aeromonas hydrophila* IN NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT – The present study aimed to evaluate the immunopharmacological potential of doxycycline, administered orally, in Nile tilapia, *O. niloticus*, through studies of: therapeutic efficacy, clinical and ecotoxicological safety. **1) Clinical safety:** 75 tilapia were used in the Nile (± 300 g) from the same spawning, placed in 15 tanks (100L), with the following treatments: T0 (not treated with Doxycycline); T1, T2, T3 and T4 (treated with 10, 20, 40 and 80mg/kg of Doxycycline p.v., respectively), in which 5 animals were sampled per treatment in 3 periods: 2, 4 and 8 days, for sample collection of blood to determine the hemogram and biochemistry, in addition to organs such as spleen, liver and kidneys (cranial and caudal) for somatic and histopathological evaluation. **2) Therapeutic efficacy:** two experimental trials were designed: 130 Nile tilapia (± 100 g) for *A. hydrophila* and 130 tilapia for *S. agalactiae*, placed in 26 100L tanks ($n=10$), with the following treatments: A0 /S0 (control, infection and not treated with Doxycycline); A1/S1, A2/S2, A3/S3 and A4/S4 (infection and treated with 20, 40 and 80mg/kg of Doxycycline p.v., respectively), as well as 10 animals for each experimental test to constitute the reference values (without treatment and without infection). Animals that survived the infectious stimulus were sampled on the 11th day of infection and 4 days after the end of treatment (15th day) to assess clinical and microbiological recovery. Blood was collected for hemogram, leukogram, burst and measurement of anti-*S. agalactiae* and anti-*A. hydrophila*. Spleen, liver and cranial kidney samples for histopathological evaluation, in addition to brain and caudal kidney for microbiological study of pathogen reisolation. **3) Ecotoxicological Assessment:** Six ecotoxicological assays and LC50 determination were designed in fish (*Hyphessobrycon eques*), aquatic plants (*Lemna minor*, *Azolla carolinia* and *Wolffia brasiliensis*), crustaceans (*Macrobrachium acanthurus*) and molluscs (*Pomacea canaliculata*). **Results:** The results of the clinical safety study showed transient clinical changes in fish treated for eight consecutive days with a dose of 80mg/kg of p.v., which showed an increase in aspartate aminotransferase enzymatic activity and a decrease in circulating hemoglobin values. Therapeutic efficacy studies revealed a dose-response effect for the control of experimental infection to LD50 stimuli for *S. agalactiae* and *A. hydrophila*, as well as in the production of anti-*S. agalactiae* and anti-*A. hydrophila*, respectively, confirming the hypothesis that the antimicrobial action of doxycycline helped the defense mechanisms of treated tilapia in both studies when compared to untreated control animals. The antimicrobial doxycycline was classified as moderately toxic for the test organism *W. brasiliensis* and practically non-toxic for the other test organisms. **Conclusion:** The immunopharmacological evaluation of doxycycline in tilapia revealed, as a whole, the potential of this antimicrobial for use in tilapia farming, as it presents therapeutic efficacy in the control of pathogens with significant sanitary and economic importance (*S. agalactiae* and *A. hydrophila*), mainly in the dose of 40 and 80mg, in addition to presenting a good margin of clinical and environmental safety.

Keywords: tetracyclines, Nile tilapia, cichlids, streptococcosis, aeromonosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

mg.kg⁻¹ – Miligramas por quilo grama.

µg.mL⁻¹ – Microgramas por mililitros.

Mg - miligrama

g – Gramas

Kg - quilograma

L – Litros.

°C – graus Celsius

mL – Mililitros

min - minutos

PBS – Phosphate buffered saline

pH – Potencial hidrogeniônico.

T – Tonelada.

% - Porcentagem

Nº - número

NaCl – Cloreto de sódio

UFC – Unidade formadora de colônia

DPT – dias pós tratamento

DPI – dias pós inoculação

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CL – concentração letal

DL – dose letal

UNESP/FCAV – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”/ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

FDA – Food and Drug Administration

OIE - Organização Mundial da Saúde Animal

p.v. – peso vivo

n – número de animais

CREBIO – Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica

CAE – concentração ambiental estimada

MIC – concentração inibitória mínima

CLSI – Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

TSB – Tryptic Soy Broth

TSA – Tryptic Soy Agar

BHI – Brain Heart Infusion broth/agar

UFC – unidades formadoras de colônias

H – horas

GLM – General Linear Model

µL - microlitro

µm – micrômetro

RPM – rotação por minuto

FA – fosfatase alcalina

AST – aspartato aminotransferase

HG – hemoglobina

HE – eritrócito

HT – hematócrito

CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

VCM – volume corpuscular médio

A0 – Inoculado com *A. hydrophila* mas não tratado com Doxiciclina (controle)

A1 – Inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 20mg Doxiciclina

A2 – Inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 40mg Doxiciclina

A3 – Inoculado com *A. hydrophila* e tratado com 80mg Doxiciclina

A4 – não inoculado e não tratado (valores de referência)

S0 – Inoculado com *S. agalactiae* mas não tratado com Doxiciclina (controle)

S1 – Inoculado com *S. agalactiae* e tratado com 20mg Doxiciclina

S2 – Inoculado com *S. agalactiae* e tratado com 40mg Doxiciclina

S3 – Inoculado com *S. agalactiae* e tratado com 80mg Doxiciclina

S4 – não inoculado e não tratado (valores de referência)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das tilápias nos diferentes tratamentos com Doxiciclina.....	16
Tabela 2. Distribuição das tilápias para avaliação da eficácia terapêutica.....	36
Tabela 3. Distribuição das tilápias para determinação da DL ₅₀ de cada bacteriose.....	37
Tabela 4. Percentual relativo de sobrevivência das tilápias infectadas com <i>A. hydrophila</i> e tratadas com diferentes doses de doxiciclina.....	47
Tabela 5. Percentual relativo de sobrevivência das tilápias infectadas com <i>S. agalactiae</i> e tratadas com diferentes doses de doxiciclina.....	54
Tabela 6. Testes ecotoxicológico realizados com Doxiciclina para diferentes organismos....	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Análise de fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase (AST) das tilápias tratadas com doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....20
- Figura 2.** Análise de creatinina, proteína total, albumina, globulina, colesterol e triglicerídeos das tilápias tratadas com doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....21
- Figura 3.** Análise da glicemia das tilápias tratadas com doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....22
- Figura 4.** Análise hematológica das tilápias tratadas com Doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....23
- Figura 5.** Análise leucocitária das tilápias tratadas com Doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....24
- Figura 6.** Avaliação somática de baço, fígado e rim das tilápias tratadas com Doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....25
- Figura 7.** Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias tratadas com doxiciclina. Observa-se perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presenças de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação sinusóide hepática. Coloração H.E, aumento de 40x.....26
- Figura 8.** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para *Aeromonas hydrophila*.....46
- Figura 9.** Análise sanguínea de tilápias após tratamento com Doxiciclina e desafiadas com *A. hydrophila*. Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey

($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....48

Figura 10. Análise leucocitária de tilápias após tratamento com Doxiciclina e desafiadas com *A. hydrophila*. Médias ($n=7$) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....49

Figura 11. Valores médios observados na determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) para tilápias inoculadas *Aeromonas hydrophila* e tratadas com diferentes doses de doxiciclina 15 dias após a inoculação (período de recuperação). Médias ($n=7$) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos.....50

Figura 12. Valores médios da densidade ótica determinada por ELISA indireto da quantidade de anticorpos anti-*Aeromonas hydrophila* em tilápias inoculadas com *A. hydrophila* e tratadas com doxiciclina. Médias ($n=7$) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....51

Figura 13. Fotomicrografias de cortes histológicos de tilápias com infecção por *Aeromonas hydrophila*. 13A. Fígado com perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presenças de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação sinusóide hepática. 13B. Baço com presença de formação de centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres. 13C. Rim apresentando túbulos necróticos, núcleos picnóticos, redução lúmen tubular, infiltrado inflamatório, retração glomerular. Coloração de H.E, aumento de 40x.....52

Figura 14. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para *Streptococcus agalactiae*.....54

Figura 15. Análise sanguínea de tilápias após tratamento com Doxiciclina e desafiadas com *S. agalactiae*. Médias ($n=7$) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....55

Figura 16. Análise leucocitária de tilápias após tratamento com Doxiciclina e desafiadas com *S. agalactiae*. Médias ($n=7$) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....56

Figura 17. Valores médios observados na determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) para tilápias inoculadas *Streptococcus agalactiae* e tratadas com diferentes doses de doxiciclina 15 dias após a inoculação (período de recuperação). Médias

(n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos.....57

Figura 18. Valores médios da densidade ótica determinada por ELISA indireto da quantidade de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias inoculadas com *S. agalactiae* e tratadas com doxiciclina. Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.....58

Figura 19. Fotomicrografias de cortes histológicos de tilápias com infecção por *Streptococcus agalactiae*. 19A. Fígado com perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presenças de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação sinusóide hepática. 19B. Baço com presença de formação de centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres. 19C. Rim apresentando glomerulonefrite membranosa com necrose tubular, isquemia glomerular, túbulos necróticos, redução lúmen tubular, espessamento hialino do mesângio e infiltrado inflamatório. Coloração H.E, aumento de 40x.....59

Figura 20. Bioindicadores utilizados nos ensaios de ecotoxicologia. 20A. Planta aquática *Lemna minor*. 20B. Planta aquática *Azolla caroliniana*. 20C. Planta aquática *Wolffia brasiliensis*.....73

Figura 21. Bioindicadores utilizados nos ensaios de ecotoxicologia. 21A. Peixe Mato Grosso (*Hyphessobrycon eques*), 21B. Molusco *Pomacea canaliculata*.....74

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui tendência de crescimento da aquicultura mundial, com produção superior a 706 mil toneladas em 2021 (FAO 2020). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um dos peixes teleósteos de água doce mais estudados e utilizados na aquicultura brasileira, sendo a produção de 432.149 toneladas (t), representando 57% de toda a Piscicultura brasileira em 2019 (Peixe BR, 2020). Com esse resultado, o Brasil consolida-se na 4ª posição entre os maiores produtores de Tilápia no mundo (Peixe BR, 2020). A prática da aquicultura deve levar em consideração conceitos de boas práticas no manejo e bem-estar animal, visto que, a maximização dos recursos produtivos na aquicultura resulta em elevação do adensamento populacional e consequente perda na qualidade da água, expondo os peixes às condições de estresse (Belo et al., 2014), resultando no aumento dos níveis circulantes de cortisol que pode levar a perdas na qualidade do pescado (Belo et al., 2012), demonstrando a importância de monitorar as condições de saúde dos peixes para detectar a ocorrência de doenças em um estágio inicial, com intuito de evitar a disseminação de agentes infecciosos nas pisciculturas (da Silva et al., 2022).

A intensificação da criação de peixes tem levado a uma maior ocorrência de surtos de várias enfermidades infecciosas oportunistas causadas principalmente por patógenos bacterianos como a *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*, o que resulta em grandes perdas econômicas ao setor (Farias et al., 2016). Além disso, a falta de informações relacionadas ao sistema imune desta espécie e sobre as respostas imunes adaptativas humorais, é um fator limitante, tanto para o sorodiagnóstico, quanto para o desenvolvimento e monitoramento mais efetivo de vacinas, impossibilitando a implementação de medidas de biossegurança na produção intensiva desta espécie (Farias et al., 2016).

Os antibióticos são usados em todo o mundo durante a produção aquícola em resposta a diversas doenças infecciosas, principalmente em sistemas de criação intensiva (Barnes et al., 2022). Entretanto, piscicultores utilizam regularmente antimicrobianos com propósitos profiláticos ou metafiláticos para reduzir a ocorrência e disseminação de infecções bacterianas (Hossain et al., 2022). Juntamente com o uso inadequado de antimicrobianos na medicina humana, o uso desses medicamentos em animais de produção e inclusive, na aquicultura está

levantando sérias preocupações, pois é um dos principais fatores que contribuem para a disseminação da resistência antimicrobiana (Santos et al., 2018). Assim, o uso indiscriminado de medicamentos off-label tem contribuído para o desenvolvimento de cepas resistentes e afetado o meio ambiente e a saúde e segurança da população (da Silva et al., 2022).

Por outro lado, os antimicrobianos ainda são um meio eficaz no tratamento de doenças na aquicultura intensiva, desse modo, não é uma realidade a não utilização desses fármacos para o setor (Smith, 2012). De acordo com Sha et al., (2022), possivelmente, a utilização de antimicrobianos aumente gradualmente em países em desenvolvimento. Portanto, é essencial enfatizar o uso racional de antimicrobianos e propor tratamento eficaz de antibióticos residuais na indústria da aquicultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualificação do problema a ser abordado

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, 2012). Neste preceito, agentes infecciosos 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 (Yousefian e Amiri, 2009).

Poucos são os antimicrobianos aprovados para o uso em aquicultura, de acordo com FDA - Food and Drug Administration, órgão regulamentador do uso de fármacos nos Estados Unidos, apenas a oxitetraciclina, o florfenicol e a sulfadimetoxina associada com ormetropim podem ser adicionados a ração e usados no controle de enfermidades bacterianas em aquicultura (FDA, 2022). Neste contexto, a segurança clínica aos animais e ao ambiente aquático juntamente com um nível mais reduzido de resíduo na carcaça, são propriedades importantes que devem estar associadas aos antimicrobianos, em adição à eficácia no controle de enfermidades bacterianas nos peixes, tornando extremamente complexo os processos de aprovação de novos fármacos (FDA, 2022).

De acordo com a Resolução XXVIII da 75ª sessão geral da comissão internacional da OIE (Organização Mundial de Sanidade Animal) que define a lista de antimicrobianos de importância na medicina veterinária, a doxiciclina apresenta significativo potencial para uso em peixes, no entanto, é necessário que seja feito o delineamento de protocolos terapêuticos eficazes para seu uso em organismos aquáticos (OIE, 2015). A doxiciclina é um antimicrobiano de amplo espectro que tem sido empregado com sucesso na produção animal, sendo via de regra administrado via oral na ração dos animais e apresentando bons resultados na avicultura (Gutiérrez et al., 2017) e suinocultura (Morés et al., 2015).

2.2. Doxiciclina

A doxiciclina é um antimicrobiano bacteriostático e lipofílico da classe das tetraciclina, apresenta amplo espectro de ação sobre bactérias (gram-negativas e gram-positivas) e protozoários, inibindo a síntese proteica (Nelson e Levy, 2011). Com boa penetração nos tecidos, a doxiciclina apresenta vantagens farmacocinéticas, por possuir boa absorção após administração via oral, e no trato gastrointestinal sofre pouca interferência de alimentos e apresenta meia-vida que propicia administração a cada 12 horas, além de apresentar baixa nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Nelson e Levy, 2011).

Os complexos de doxiciclina com íons metálicos são instáveis em pH ácido, portanto, mais doxiciclina entra no duodeno para absorção quando se compara com outras tetraciclina. Além disso, os alimentos têm menos efeito na absorção do fármaco, sendo as concentrações séricas de doxiciclina reduzidas em cerca de 20% por interações com alimentos quando comparadas com 50% para as tetraciclina (Agwuh e MacGowan, 2006). De acordo com Yang et al. (2014), a farmacocinética da doxiciclina em tilápias foi estudada no plasma após uma dose única (20 mg/kg) administrada via oral, sendo observado lenta e incompletamente absorção, porém a doxiciclina foi extensivamente distribuída e lentamente eliminada e para estes autores a doxiciclina pode sofrer reciclagem entero-hepática na tilápia.

Nakamura (1982) provou a eficácia terapêutica de 20mg de doxiciclina/kg de p.v., administrada via oral na ração, para o tratamento de estreptococose em Yellow-tail, *Seriola quinquiradiata*. Para este autor, a doxiciclina demonstrou estabilidade na dieta dos peixes, muito baixa toxicidade para os animais, confirmando a sua segurança terapêutica, além de apresentar rápida absorção e distribuição sistêmica. Em outro estudo a segurança clínica da

doxiciclina foi observada após oito meses de tratamento em peixes pulmonados australianos (*Neoceratodus fosteri*), submetidos à terapia tripla envolvendo doxiciclina para o tratamento de micobacteriose por *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. peregrinum* (Strike et al., 2017). Segundo estes autores esta terapia antibiótica foi a mais eficaz, resultando em resolução completa da doença e nenhum efeito colateral observado.

Trezentos isolados de *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda* foram testados para 16 antimicrobianos. Este estudo revelou dentre os fármacos testados que 70% dos isolados foram sensíveis à doxiciclina (Lee e Wend, 2017). Na piscicultura o uso de outras tetraciclina como a oxitetraciclina é realizado para o tratamento de doenças infecciosas como: doença bacteriana da água fria, doença da boca vermelha, septicemia provocada por *Edwardsiella tarda* e *Edwardsiella ictaluri*, septicemia por *Aeromonas sp.* e *Pseudomonas fluorescens*, entre outras (Austin e Newaj-Fyzul, 2017).

Seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da síntese de proteínas microbianas por meio da interação com as subunidades ribossomais 30S e bloqueia a leitura do anticódon do tRNA do mRNA bacteriano, interrompendo o crescimento bacteriano, apresentando às células imunes do hospedeiro para lisar a célula bacteriana (Eisen, 2017). A doxiciclina se liga e modifica a tradução decrescente do ribossomo 80S humano e também ativa seletivamente a resposta ao estresse integrado celular (ISR) (Holmes e Charles, 2009). A doxiciclina também é identificada por interferir na síntese proteica mitocondrial devido à semelhança evolutivamente conservada entre o ribossomo bacteriano e mitocondrial, causando desequilíbrio proteico mitocondrial. Este desequilíbrio da proteína mitocondrial causa biogênese mitocondrial prejudicada, que é usada como uma nova estratégia terapêutica para atingir células cancerígenas, já que células cancerígenas desprovidas de mitocôndrias foram observadas como mais suscetíveis a drogas citotóxicas. Além de sua ação em células procarióticas e eucarióticas, a doxiciclina também é identificada por possuir potentes aplicações antivirais (Narendrakumar, et al, 2021).

2.3. Tilapicultura

A aquicultura brasileira produziu cerca de 629.341 t em 2020, sendo a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) a mais importante espécie de peixe criada no Brasil, atingindo 343.595 toneladas, correspondendo a 55% da aquicultura nacional em 2020, atingindo taxa média de crescimento

de 11% ao ano, comparado a aquicultura geral que cresceu apenas 4% ao ano (IBGE, 2019). Esse crescimento é promovido pela maximização da produção e pela formação de conjuntos produtivos em várias partes do país (Ribeiro et al., 2022).

Esse resultado coloca o Brasil entre os quatro maiores produtores do mundo, atrás de China, Indonésia e Egito (Peixe BR, 2020). O Paraná é o maior produtor de Tilápia do Brasil, com 146.212 toneladas, seguido de São Paulo (64.900 t), Santa Catarina (38.559 t), Minas Gerais (36.350 t) e Pernambuco (25.421 t). Juntos, os cinco estados maiores produtores de Tilápia do Brasil representam 57% da produção nacional (Peixe BR, 2020). Segundo o estudo realizado pelo extinto Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), o país se tornará um dos maiores produtores do mundo até 2030, com produção intensiva de espécies amazônicas e da tilápia, que cresce 17% ao ano (Brasil, 2014).

Existem 70 espécies de tilápias distribuídas em 4 gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, *Tillapia* e *Danakilia*. Dessas, somente o gênero *Oreochromis* apresenta viabilidade para a aquicultura mundial, em virtude dos índices de produtividade e adaptação a condições de cativeiro. As principais espécies criadas são: *O. niloticus* (tilápia do Nilo), *O. mossambicus* (tilápia de Moçambique), *O. aureus* (tilápia aurea ou azul) e *O. urolepi shornorum* (tilápia zamzibar) (Sebrae, 2015). 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.

A aquicultura continua a desempenhar um papel importante na produção de alimentos no mundo, fornecendo proteína de alta qualidade. No entanto, a indústria aquícola está cada vez mais ameaçada por vários patógenos que causam enormes perdas econômicas na produção e representam riscos para a saúde do consumidor. *S. agalactiae*, *Aeromonas* sp., *Edwardsiella tarda*, entre outros agentes etiológicos de doenças infecciosas, tornaram-se um dos fatores mais importantes que limitam o desenvolvimento sustentável da tilapicultura, ocasionando enormes prejuízos para a indústria piscícola mundial. Portanto, a identificação de mecanismos e métodos de prevenção para resistir as infecções por patógenos são questões urgentes necessárias para a produção de aquicultura sustentável (Zhang et al., 2019; Wang et al., 2018).

2.4. *Streptococcus agalactiae*

O *S. agalactiae* é classificado como do grupo B Lancefield apresentando células esféricas ou cubóides. Esta bactéria é Gram-positiva, catalase negativa e as suas células se unem em forma de pares ou cadeias (Roberts, 2012). É imóvel, não esporulada e anaeróbia facultativa. Obtém energia por meio da fermentação de carboidratos como a glicose (Hardie e Whiley, 1997). São 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 (Hernandez et al., 2009).

A estreptococose é uma das doenças bacterianas mais importantes que afetam as criações de tilápia em todo o mundo (Ortega et al., 2017). Nos peixes, o quadro clínico principal é a meningoencefalite que provoca movimentos giratórios dos peixes na superfície da água, escurecimento da pele acompanhada de letargia, anorexia e exoftalmia. Estes sinais clínicos geralmente estão associados à perda de apetite, hemorragia ocular, opacidade da córnea, abdome distendido, curvatura da medula espinhal, natação irregular, rigidez e sangramento na base das barbatanas (Asencios et al., 2016). Normalmente, infecções em grande escala ocorrem em estações relativamente quentes, especialmente no verão. A taxa de mortalidade pode chegar a 50-70% em menos de uma semana (Zhang, 2021).

O diagnóstico da infecção por *S. agalactiae* é baseado em sinais clínicos, lesões histopatológicas, isolamento microbiológico, identificação específica por meio de técnicas moleculares como o PCR e imunodiagnóstico (Eto et al., 2018). Na necropsia, destacam-se alterações macroscópicas como hemorragia na pele, esplenomegalia, hepatomegalia, ascite, palidez dos órgãos e aderências viscerais. (Laith et al., 2017). Histologicamente, as lesões que ocorrem são severa inflamação granulomatosa no cérebro, epicárdio, meninges e olhos e também necrose, vacuolização de hepatócitos e congestão esplênica (Inocente Filho et al, 2009).

Antibióticos (como oxitetraciclina, eritromicina, penicilina, β -lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, cefalosporina e quinolona) são amplamente utilizados para tratamento de doenças bacterianas em peixes como a estreptococose. No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos por piscicultores pode levar ao surgimento de cepas resistentes aos medicamentos e pode criar sérios problemas de saúde pública, pois alguns estreptococos são agentes zoonóticos (Park et al., 2009).

2.5. *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila é uma bactéria Gram-negativa, móvel, anaeróbica facultativa, catalase e oxidase positiva, que se apresenta em forma de bastonete curto, com um único flagelo polar e que normalmente habitam o ambiente aquático e faz parte da microbiota intestinal de animais aquáticos e terrestres (Praveen et al., 2016). As bactérias do gênero *Aeromonas* possuem fatores de virulência como hemolisinas, aerolisinas, proteases, adesinas, enterotoxinas, fosfolipase e lipase (Stratev et al., 2016). Esta bactéria é um patógeno oportunista, que pode causar sérias perdas econômicas na aquicultura, sendo responsável por surtos de doenças infecciosas graves com alta mortalidade em peixes (Farias et al., 2020). A septicemia por *Aeromonas* pode ser induzida quando os peixes estão sob condições estressantes de alta temperatura e má qualidade da água, hipóxia, infecções parasitárias, alta densidade de estocagem, manuseio inadequado e transporte inadequado (Belo et al., 2012).

Os principais sinais clínicos causados por aeromonose são: septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias focais, principalmente em brânquias e opérculos, úlceras, abscessos, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode ocorrer acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e nos rins (Garcia et al., 2007).

Os métodos de prevenção e controle de doenças na piscicultura normalmente incluem vacinas e o uso de antimicrobianos comerciais (Ariede et al., 2020). Foi relatado que *A. hydrophila* são resistentes à penicilina e ampicilina, mas sensíveis a aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, quinolonas e cefalosporinas de segunda e terceira geração (Stratev et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O presente estudo tem por objetivos avaliar a eficácia terapêutica, incluindo sua possível ação sobre as respostas imunes humorais, a segurança clínica e ecotoxicológica do antibiótico doxiciclina, administrado via oral na ração, para o tratamento de *S.agalactiae* e *A. hydrophila* em tilápias do Nilo, *O.niloticus*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a inocuidade do composto em estudo de dose-resposta quantal, determinando-se a segurança clínica nas doses de 10, 20, 40 e 80 mg de doxiciclina/kg de p.v.;
- Estudar a eficácia das doses terapêuticas de 20, 40 e 80 mg de doxiciclina/kg de p.v. em peixes desafiados experimentalmente com inóculos vivos de *S.agalactiae* e *A. hydrophila*, incluindo o possível efeito sobre as respostas imunes humorais;
- Realizar seis ensaios de ecotoxicidade com determinação de CL50: em peixes (*H. eques*); plantas aquáticas (*L. minor*, *A. carolinia* e *W. brasiliensis*), crustáceos (*M. acanthurus*) e moluscos (*P. canaliculata*).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGWUH, K. N.; MACGOWAN, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, n. 2, p. 256–265, 2006.
- ARIEDE, R. B.; FREITAS, M. V.; AGUDELO, J. F.; BORGES, C. H.; LIRA, L. V.; YOSHIDA, G. M.; ... HASHIMOTO, D. T. Genetic (co) variation between resistance to *Aeromonas hydrophila* and growth in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Aquaculture**. v. 523, p. 735225, 2020.
- ASENCIOS, Y. O.; SÁNCHEZ, F. B.; MENDIZÁBAL, H. B.; PUSARI, K. H.; ALFONSO, H. O.; SAYÁN, A. M.; ... CHAUPE, N. S. First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: Molecular identification and histopathological lesions. **Aquaculture Reports**. v. 4, p. 74-79, 2016.
- AUSTIN, B.; NEWAJ-FYZUL, A. Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish. **John Wiley & Sons**. (Eds.). (2017), p. 265.
- BARNES, A. C.; SILAYEVA, O.; LANDOS, M.; DONG, H. T.; LUSIASTUTI, A.; PHUOC, L. H.; DELAMARE-DEBOUTTEVILLE, J. Autogenous vaccination in aquaculture: A locally enabled solution towards reduction of the global antimicrobial resistance problem. **Reviews in Aquaculture**. v. 14, n. 2, p. 907-918, 2022.
- 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, p. 124-128, 2014.

- BELO, M. A. A.; MORAES, J. R. E. D.; SOARES, V. E.; MARTINS, M. L.; BRUM, C. D.; MORAES, F. R. D. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 47, n.7, p. 1015-1021, 2012.
- BRASIL, ASSOCIAÇÃO CULTURAL E EDUCACIONAL. 1º brazilian fishery and aquaculture Yearbook. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. 1ed, p. 136, 2014. Acessado em 06 de março de 2022.
- DA SILVA, A. M. S.; CHAGAS, E. C.; CHAVES, F. C. M.; DE ALEXANDRE S. F. Prospecting of essential oils in combination with florfenicol against motile *Aeromonas* isolated from tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Archives of Microbiology**. v. 204, n. 7, p. 1-12, 2022.
- EISEN, D. P. Doxycycline. In Kucers' the use of antibiotics (pp. 1204-1229). CRC Press, 2017.
- ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; BALDASSI, A. C.; MANRIQUE, W. G.; ... & SAMARA, S. I. Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & shellfish immunology**. v. 76, p. 153-160, 2018.
- FAO—Organização alimentar e agrícola (2020) O Estado das Pescas Mundiais e da Aquacultura Roma: FAO. Disponível em <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1279825/>
- FARIAS, T. H. V.; ARIJO, S.; MEDINA, A.; PALA, G.; PRADO, E. J. R.; MONTASSIER, H. J., ... BELO, M. A. A. Immune responses induced by inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & shellfish immunology**. v. 101, p. 186-191, 2020.
- FARIAS, T. H. V.; LEVY-PEREIRA, N.; DE OLIVEIRA ALVES, L.; DE CARLA DIAS, D.; TACHIBANA, L.; PILARSKI, F.; ... RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**. v. 211, p. 137-144, 2016.
- FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Approved aquaculture drugs. New Hampshire: U.S. Food and Drug Administration, 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs>

- GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; DE MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**. v. 271, n. 1-4, p. 39-46, 2007.
- GUTIÉRREZ, L.; ZERMEÑO, J.; ALCALÁ, Y.; SUMANO, H. Higher bioavailability of doxycycline in broiler chickens with a novel in-feed pharmaceutical formulation. **Poultry Science**. v. 96, n. 8, p. 2662-2669, 2017.
- HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 83, p. 1–11, 1997.
- HERNANDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis sp.*: a case study. **Journal of Fish Diseases**. v. 32, p. 247- 52, 2009.
- HOLMES, N. E.; CHARLES, P. G. Safety and efficacy review of doxycycline. Clinical Medicine. **Therapeutics**. v. 1, p. CMT-S2035, 2009.
- HOSSAIN, A.; HABIBULLAH-AL-MAMUN, M.; NAGANO, I.; MASUNAGA, S.; KITAZAWA, D.; MATSUDA, H. Antibiotics, antibiotic-resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: risks, current concern, and future thinking. **Environmental Science and Pollution Research**. p. 1-22, 2022.
- IBGE Dados de: Produção Municipal de Gado [conjunto de dados] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Repositório Digital (2019) disponível a partir de <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>
- INOCENTE FILHO, C.; MÜLLER, E. E.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 2, n.1, p.12-15, 2009.
- LAITH, A. A.; AMBAK, M. A.; HASSAN, M.; SHERIFF, S. M.; NADIRAH, M.; DRAMAN, A. S.; ... NAJIAH, M. Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary World**. v. 10, n. 1, p. 101-111, 2017.
- LEE, S. W.; WENDY, W. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* isolated from red hybrid tilapia (*Oreochromis spp.*) coinfectd with motile aeromonas septicemia and edwardsiellosis. **Veterinary World**. v. 10, n. 7, p. 803-807, 2017.

- MORÉS, M. A.; OLIVEIRA FILHO, J. X.; REBELATTO, R.; KLEIN, C. S.; BARCELLOS, D. E.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N. Aspectos patológicos e microbiológicos das doenças respiratórias em suínos de terminação no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 8, p. 725-733, 2015.
- NAKAMURA, Y. Doxycycline. **Fish Pathology**. v. 17, p. 67-76, 1982.
- NARENDRAKUMAR, L.; JOSEPH, I.; THOMAS, S. Potential effectiveness and adverse implications of repurposing doxycycline in COVID-19 treatment. **Expert review of anti-infective therapy**. v. 19, n. 8, p. 1001-1008, 2021.
- NELSON, M. L.; LEVY, S. B. The history of the tetracyclines. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1241, p. 17-32, 2011.
- OIE – World Organization for Animal Health. OIE list of antimicrobials of veterinary importance(2015).http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf. Acessado 06 março de 2022.
- ORTEGA, Y.; BARREIRO, F.; CASTRO, G.; HUANCARÉ, K.; MANCHEGO, A.; BELO, M. A.; ... SANDOVAL, N. C. Estreptococos beta-hemolítico en tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en Sullana, Piura-Perú. **Revista MVZ Córdoba**. v. 22, n. 1, p. 5653-5665, 2017.
- PARK, Y. K.; NHO, S. W.; SHIN, G. W.; PARK, S. B.; JANG, H. B.; CHA, I. S.; JUNG, T. S. Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Veterinary Microbiology**. v. 136. n. 1-2, p. 76-81, 2009.
- PEIXE BR (Associação Brasileira da Piscicultura). Anuario PeixeBR da piscicultura 2020.<https://www.peixebr.com.br/Anuario2020/AnuarioPeixeBR2020.pdf>. Acessado em 06 de março de 2022.
- PRAVEEN, P. K.; DEBNATH, C.; SHEKHAR, S.; DALAI, N.; GANGULY, S. Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. **Veterinary World**. v. 9, n. 1, p. 6, 2016.
- RIBEIRO, V. S.; PEDROZA FILHO, M. X. Regional analysis of aquaculture value chain: Study of tilapia production zones in Brazil. **Aquaculture**. p. 737948, 2022.
- ROBERTS, R. J. The bacteriology of teleosts. **Fish pathology**. p. 339-382, 2012.

- SANTOS, L.; RAMOS, F. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 52, n. 2, p. 135-143, 2018.
- SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). Aquicultura no Brasil, 2015. [http://www.sebrae.com.br/REVISÃO\(tilapicultura\).pdf](http://www.sebrae.com.br/REVISÃO(tilapicultura).pdf). Acessado em 06 de março de 2020.
- SHA, S.; DONG, Z.; GAO, Y.; HASHIM, H.; LEE, C. T.; LI, C. In-situ removal of residual antibiotics (enrofloxacin) in recirculating aquaculture system: effect of ultraviolet photolysis plus biodegradation using immobilized microbial granules. **Journal of Cleaner Production**. v. 333, p. 130190, 2022.
- SMITH, P. Antibiotics in aquaculture: reducing their use and maintaining their efficacy. In: **Infectious Disease in Aquaculture**. Woodhead Publishing, p. 161-189, 2012.
- STRATEV, D.; ODEYEMI, O. A. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. **Journal of infection and public health**. v. 9, n. 5, p. 535-544, 2016.
- STRIKE, T. B.; FELTRER, Y.; FLACH, E.; MACGREGOR, S. K.; GUILLAUME, S. Investigation and management of an outbreak of multispecies mycobacteriosis in Australian lungfish (*Neoceratodus fosteri*) including the use of triple antibiotic treatment. **Journal of Fish Diseases**. v. 40, n. 4, p. 557-570, 2017.
- WANG, M.; JIANG, S.; WU, W.; YU, F.; CHANG, W.; LI, P.; WANG, K. Non-coding RNAs function as immune regulators in teleost fish. **Frontiers in immunology**. v. 9, p. 2801, 2018.
- YANG, F.; LI, Z. L.; SHAN, Q.; ZENG, Z. L. Pharmacokinetics of doxycycline in tilapia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*) after intravenous and oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 37, n. 4, p. 388-393, 2014.
- 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.
- ZHANG, D.; GAO, Y.; KE, X.; YI, M.; LIU, Z.; HAN, X.; SHI, C.; LU, M. *Bacillus velezensis* LF01: in vitro antimicrobial activity against fish pathogens, growth performance enhancement, and disease resistance against streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Applied microbial and cell physiology**. v. 103, p. 9023–9035, 2019.

- ZHANG, Z. Research advances on *Tilapia streptococcosis*. **Pathogens**. v. 10, n. 5, p. 558, 2021.
- ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva in CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos Especiais em Piscicultura de água Doce Tropical Intensiva. **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, Jaboticabal, Brasil, SP, p. 239-266, 2004.

CAPÍTULO 2 – Avaliação da segurança clínica de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratadas via oral com Doxiciclina

Susana Luperini de Oliveira¹, Camila Carlino da Costa¹, Mayumi Fernanda Aracati¹, Leticia Franchin Rodrigues¹, Gabriel Conde¹, Romário Alves Rodrigues², Claudinei da Cruz³, Hélio José Montassier⁴

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

² Departamento de Microbiologia de alimentos, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

³ Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia do Agrotóxicos, UNIFEB, Barretos/SP.

⁴ Departamento de Patologia animal, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

Resumo – Este estudo teve por objetivo avaliar a segurança clínica do tratamento com diferentes doses de Doxiciclina (Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda.), administrada via oral incorporada à ração em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Para tal, foram utilizadas 75 tilápias no Nilo (*O. niloticus*), $\pm 300\text{g}$, oriundas da empresa Aquabel, localizada em Porto Ferreira/SP, da mesma desova, acondicionadas em 15 tanques ($n=5$), com capacidade de 100 L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, sendo constituído os seguintes tratamentos: T0 (Controle - não tratado com Doxiciclina); T1, T2, T3 e T4 (tratados com 10, 20, 40 e 80mg/kg de p.v. de Doxiciclina, respectivamente), tendo sido amostrados 5 animais por tratamento em 3 períodos: 2, 4 e 8 dias pós-tratamento (DPT). Foram coletadas amostras de sangue para determinação do hemograma, leucograma e avaliação de parâmetros bioquímicos séricos, além de órgãos como baço, fígado e rins (cranial e caudal) para avaliação somática e histopatológica. Os resultados mostraram algumas alterações clínicas transitórias em peixes tratados durante oito dias consecutivos com a dose de 80mg/Kg de p.v. de doxiciclina, as quais se caracterizaram por aumento de atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST) e diminuição dos valores circulantes de hemoglobina, entretanto as demais doses testadas desse antibiótico nas tilápias apresentaram boa margem de segurança clínica.

Palavras chave: *Oreochromis niloticus*, antimicrobiano, segurança clínica, hemograma, bioquímico sérico.

1. INTRODUÇÃO

A doxiciclina é um antimicrobiano sintético da classe tetraciclina, de segunda geração, que apresenta melhor propriedades farmacocinéticas e baixa toxicidade, quando comparada as tetraciclina de primeira geração (Valentin et al., 2009). Foi desenvolvida em 1967 pela Pfizer, possuindo ação sistêmica e várias vantagens sobre outros membros da família das tetraciclina, como atividade de amplo espectro, melhor absorção oral, alta lipofilicidade e permeabilidade e meia-vida de eliminação prolongada (18-22 horas) (Holmes et al., 2009). Além disso, em comparação à tetraciclina original, as sintéticas possuem melhores esquemas de dosagem e são mais facilmente absorvidos quando ingeridos com alimentos (Smith e Leyden, 2005). Também possuem propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladora e antioxidante, que a tornam uma opção terapêutica promissora para o tratamento de várias doenças infecciosas (Sharma et al., 2022).

A doxiciclina possui atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e 'atípicas', bem como alguns protozoários, como a malária (Holmes et al., 2009). É uma droga bem tolerável, muito utilizado no tratamento de doenças infecciosas (Smith e Leyden, 2005; Holmes et al., 2009). É considerada uma droga bacteriostática, pois em seu mecanismo de ação ocorre a inibição da síntese de proteínas bacterianas, pois este antimicrobiano liga-se reversivelmente à subunidade ribossômica 30S e impedindo a associação do aminoacil-tRNA com o ribossomo bacteriano (Holmes et al., 2009). Além disso, possui várias outras ações, incluindo prevenção de angiogênese e apoptose, aumento da fixação de fibroblastos gengivais e cicatrização de feridas (Stechmiller et al., 2010). Apresentam como principais efeitos adversos distúrbios gastrointestinais, esofagite e fotossensibilidade, porém podem ser evitadas com atenção cuidadosa à administração correta (Smith e Leyden, 2005).

Nos sistemas de produções nas pisciculturas, quando há surtos de doenças infecciosas bacterianas, uma das alternativas de tratamento é o uso de antimicrobianos (Aracati et al., 2021). A segurança e tolerabilidade desses fármacos sempre foi de grande interesse e preocupação para quem recebe, mas principalmente para quem prescreve os medicamentos, pois a incidência exata de efeitos adversos específicos é de difícil avaliação, com isso, é necessário vários estudos e testes clínicos para confirmação (Owens e Ambrose, 2005). Entretanto, em peixes, os medicamentos registrados para uso nas pisciculturas são escassos

(Oliveira et al., 2021). De acordo com o FDA – Food and Drug Administration, órgão regulamentador do uso de drogas nos Estados Unidos, os antimicrobianos aprovados para uso em aquicultura são apenas a oxitetraciclina, florfenicol e sulfadimetoxina associada com ormetropim (FDA, 2022). Nesta perspectiva, a inocuidade é um fator de extrema importância nos estudos farmacológicos e o uso indiscriminado de antimicrobianos, bem como altas doses, são limitados pelo risco de toxicidade, seleção de resistência e eficácia reduzida (Bassetti et al., 2018). Desta forma, é de extrema importância o estudo da segurança ao ambiente aquático, segurança clínica de antimicrobianos em peixes, que geralmente são realizados através de exames hematológicos, histopatológicos e testes bioquímicos na qual são técnicas que avaliam os parâmetros essenciais das condições fisiológicas dos peixes (Costa et al., 2022; Oliveira et al., 2021).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Peixes e acondicionamento

Para o estudo de segurança clínica da Doxiciclina, foram utilizadas 75 tilápias do Nilo ($\pm 300\text{g}$) oriundas da mesma desova da fazenda Aquabel (Porto Ferreira, SP, Brasil), acondicionadas em 15 tanques (100L de água cada, $n=5$) abastecido com água corrente sem adição de cloro e proveniente de poço artesiano com sistema de recirculação com vazão de 1L/min. Após serem transportados aos devidos tanques, os peixes foram aclimatados por 15 dias, tempo necessário para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltassem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banho com solução de NaCl na concentração de 6,0g/L (Carneiro e Urbinati, 2001). Os animais receberam ração comercial extrusada com 36% de proteína bruta (Nutripiscis® - Empesa Presence), constituindo-se na dieta basal. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, às 8h e às 17h, correspondendo a 2% da biomassa dos tanques. Os parâmetros de qualidade da água foram determinados duas vezes ao dia durante todo o período experimental utilizando pHmetro YSI-63 e oxímetro Y-55, tendo sido registrados valores que permaneceram dentro da faixa adequada para o bem-estar de peixes tropicais (Boyd, 1990) (oxigênio dissolvido = $4,07 \pm 0,89 \text{ mg L}^{-1}$; temperatura = $27,64 \pm 2,05^\circ\text{C}$; pH = $7,64 \pm 0,54$; e condutividade = $208,29 \pm 97,57 \mu\text{S/cm}$). Os procedimentos experimentais foram

aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UNESP/FCAV sob protocolo nº 5315/20.

2.2. Delineamento experimental

As tilápias foram distribuídas aleatoriamente em 15 tanques (100L de água, n=5) para compor os seguintes tratamentos: T0 (grupo controle, não tratado com Doxíciclina); T1, T2, T3 e T4 (tratados com 10, 20, 40 e 80mg/kg de p.v. de Doxíciclina, respectivamente). Cinco animais foram amostrados por tratamento em 3 períodos, isto é, 2, 4 e 8 dias, para colheita de amostras de sangue para determinação do hemograma, leucograma e bioquímico, além de órgãos como baço, fígado e rins (cranial e caudal) para avaliação somática e histopatológica.

Tabela 1. Distribuição das tilápias nos diferentes tratamentos com Doxíciclina.

Grupos	Tratamentos	Dias após início do tratamento com Doxíciclina		
		2	4	8
T0	Controle (não tratado com Doxíciclina)	N=5	N=5	N=5
T1	Tratados com 10 mg/kg de p.v. de Doxíciclina	N=5	N=5	N=5
T2	Tratados com 20 mg/kg de p.v. de Doxíciclina	N=5	N=5	N=5
T3	Tratados com 40 mg/kg de p.v. de Doxíciclina	N=5	N=5	N=5
T4	Tratados com 80 mg/kg de p.v. de Doxíciclina	N=5	N=5	N=5

2.3. Dieta experimental

A ração comercial extrusada, contendo proteína bruta 36%, umidade 12%, extrato etéreo 70 g/kg, matéria mineral 140 g/kg, fibra bruta 50 g/kg, cálcio 25 g/kg, fósforo 8 g/kg e vitamina C 350 mg/kg. (Nutripiscis® - Empresa Presence) foi utilizada para compor as dietas experimentais das tilápias. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia (8h e 17h), com administração de 2% da biomassa dos tanques. Para o preparo das dietas, diariamente a ração era pesada proporcionalmente ao peso médio das tilápias de cada tanque. Em seguida, era adicionado a Doxíciclina (Doxíciclina: Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda.) nas doses de 10, 20, 40 e 80mg/kg p.v. e homogeneizado em 2% de óleo vegetal, compondo as

dietas de T1, T2, T3 e T4 respectivamente. Para padronização das dietas e balanço nutricional, foi adicionado 2% de óleo vegetal à dieta do grupo controle (T0).

2.4. Anestesia dos peixes

As tilápias foram anestesiadas por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para coleta de sangue e 1:500 no momento da eutanásia. A benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando o volume para 1L (Wedemeyer, 1970). Inicialmente foi realizado pré-anestesia, em que o nível de água dos tanques era baixado até um volume de 10L adicionando-se 0,1g de benzocaína já diluída em álcool 98°. Logo após, cada peixe era transferido para um recipiente contendo 1L de água com 0,1g de benzocaína, ambos os procedimentos eram realizados em aeração para minimizar estresse ocasionado pela manipulação. Logo que o opérculo parava de se movimentar, o peixe era retirado e realizado a coleta de sangue. Por fim, o animal era transferido para outro recipiente contendo 0,5g de benzocaína diluída em 1L de água para eutanásia.

2.5. Coleta de sangue e análise hematológica

Cinco peixes por tratamento (um tanque para cada tratamento), após serem anestesiados, era coletado cerca de três mL de amostras de sangue pelo vaso caudal de cada animal aos 2, 4 e 8 dias após tratamento (DPT), que foram aliquotadas em dois conjuntos: uma seringa revestida de heparina (5000 UI) e outra sem heparina, para obtenção de plasma e soro, respectivamente. Durante troca de seringas (com e sem heparina), não era retirado a agulha do vaso, para que não se tenha perda de sangue. O hemograma foi realizado por hemocítômetro (câmara de Neubauer) e solução de Natt e Herrick (1952) na proporção 1:100 v:v). O hematócrito foi determinado pela técnica de centrifugação do microhematócrito. Já a hemoglobina circulante, utilizando-se reagente de Rabkin's para leitura em comprimento de onda de 540nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo $VCM = (HT/HE) \times 100$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $CHCM = (HG/HT) \times 100$. As contagens totais e diferenciais de leucócitos foram realizadas em extensões sanguíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo

celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald Giensa Wright (BELO et al., 2013).

2.6. Avaliação bioquímica sérica

Amostras de sangue de peixes sem anticoagulante foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C para obtenção de soro e determinação de fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, albumina, proteína total, colesterol, triglicerídeos e globulina, usando um analisador bioquímico semiautomático (Model LabQuest® - Bioplus Company) e a glicemia dos peixes foi determinada usando o aparelho Accu-Chek Performa.

2.7. Avaliação morfométrica e histopatológica dos órgãos

Após 2, 4 e 8 dias de tratamento, as tilápias foram submetidas a eutanásia por imersão em solução aquosa de benzocaína (1:500) até o aprofundamento do plano anestésico e perda completa dos movimentos operculares. Em seguida, pesadas e dissecadas por um corte longitudinal ventral, do ânus ao opérculo; outro do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral. Esta dissecação permitiu ampla visão de todos os órgãos. Para avaliação morfométrica de acordo com Weibel et al. (1969), foram coletados fígado, rim caudal, rim cranial e baço das tilápias, em que posteriormente foram pesados para expressar o índice somático hepático, renal e esplênico, calculado pelo formula: Índice somático = peso do órgão X 100/peso corporal.

Para os exames histopatológicos foram avaliados fígado, rim caudal, rim cranial e baço. Imediatamente após coletar um fragmento de cada órgão, eles foram fixados em formol a 10% e após 24 horas, os fragmentos foram transferidos para o álcool 70%, sendo então encaminhado para preparo das peças no laboratório de patologia veterinária, emblocados em parafina e feitos cortes com espessura aproximada de 5µm e corados em hematoxilina e eosina. A leitura foi realizada em microscópio óptico para determinação de possíveis alterações histopatológicas.

2.8. Análise estatística

O desenho experimental para avaliação da segurança clínica foi inteiramente randomizado em esquema fatorial 5 x 3 (cinco tratamentos: 10, 20, 40, 80 e controle X três períodos de

avaliação: 2, 4 e 8 DPT). As análises de variância para comparar os diferentes grupos experimentais foram realizadas utilizando o procedimento GLM (General Linear Model) do programa SAS, versão 9.3 (Statistical Analysis Software, 2012). Diferenças significativas ($P < 0.05$) foram estimadas com base no teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

3. RESULTADOS

3.1. Análise de parâmetros bioquímicos séricos

Na análise de citotoxicidade hepática das tilápias tratadas com doxiciclina (Figura 1), não foi observado alterações significativas na atividade sérica enzimática de fosfatase alcalina, entretanto, os níveis séricos de AST foram significativamente superiores ($P < 0.05$) nos animais tratados com 80 mg de doxiciclina no período mais prolongado do tratamento (8 DPT), em comparação aos animais tratados com a menor dose (10mg) e do grupo controle. Tal resultado também foi observado no decorrer do tempo, em que, o tratamento com 80 mg provocou um aumento dessa enzima no período mais tardio do tratamento.

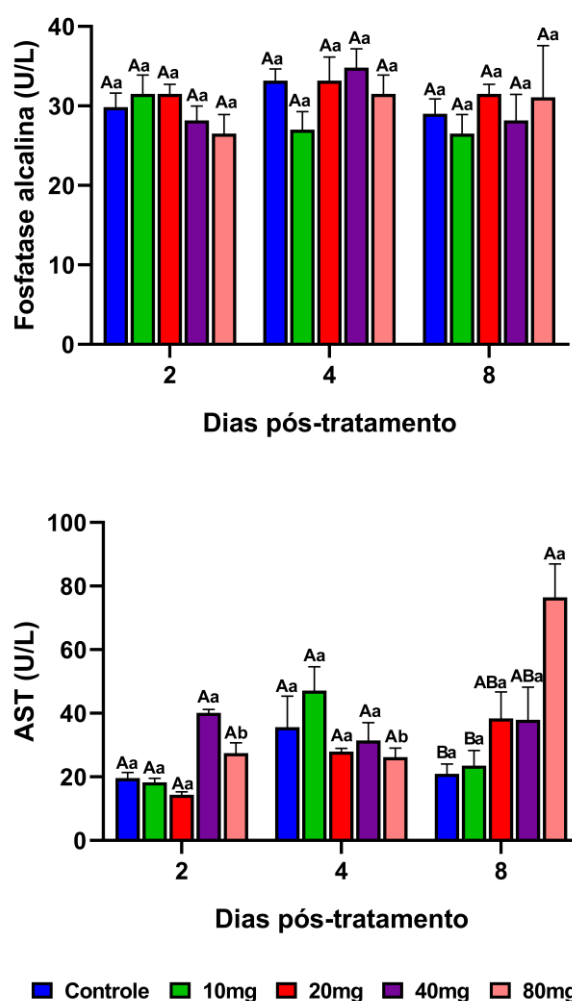


Figura 1. Análise de fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase (AST) das tilápias tratadas com doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

Na avaliação da funcionalidade hepática do tratamento com Doxiciclina (Figura 2), não foram observadas alterações significativas nos valores séricos de proteína total, colesterol, triglicerídeos e globulina. Também não foi observado alterações nos valores séricos de creatinina. No entanto, após 4 dias de tratamento com 80 mg de doxiciclina foi observado um pico de albumina e seus valores retornaram nos seus níveis basais no oitavo dia.

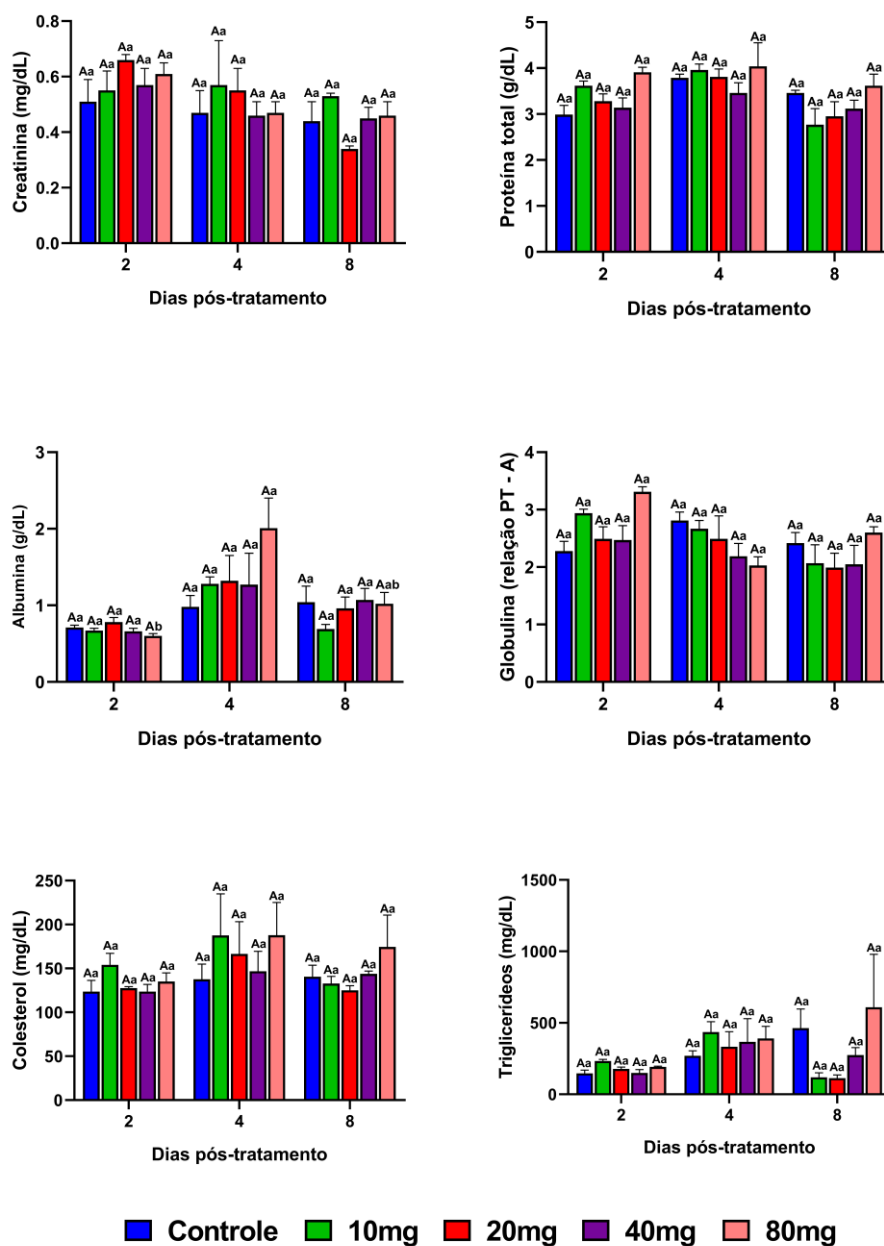


Figura 2. Análise de creatinina, proteína total, albumina, globulina, colesterol e triglicerídeos das tilápias tratadas com doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

A avaliação de glicemia (Figura 3) revelou diminuição após 4 dias de tratamento no grupo controle e no que foi tratado com 10 mg de doxiciclina, após 8 dias de tratamento, essa diminuição foi observada em todos os grupos, exceto no tratado com 80 mg de doxiciclina em

que não foi observado diminuição, mantendo-se constantemente elevado em todo o período de avaliação.

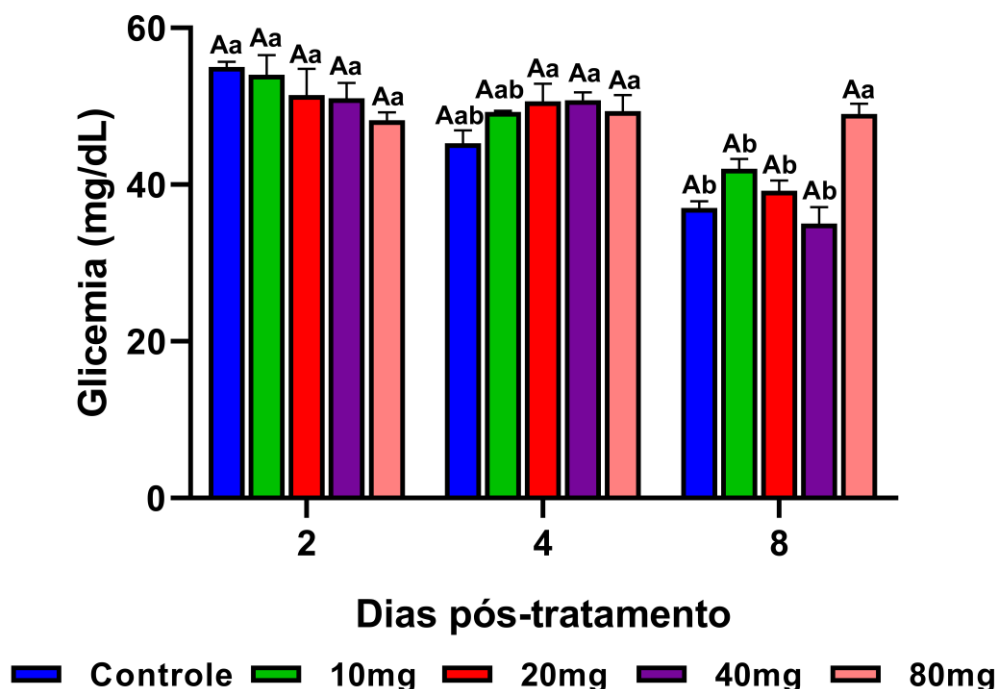


Figura 3. Análise da glicemia das tilápias tratadas com doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.2. Análise hematológica

Na avaliação hematológica das tilápias tratadas com doxiciclina (Figura 4) não foi observado alterações significativas ($P > 0.05$) nos valores de hematócrito, VCM, HCM e CHCM. Porém, observou-se que após 8 dias de tratamento houve diminuição significativa ($P < 0.05$) nos valores séricos de hemoglobina nos animais tratados com 40 e 80 mg de doxiciclina em comparação com os animais do grupo controle. No decorrer do tempo, foi observado que os animais tratados com 40 mg tiveram uma diminuição significativa nos níveis de hemoglobina e os animais tratados com 80 mg tiveram um aumento de eritrócitos circulantes.

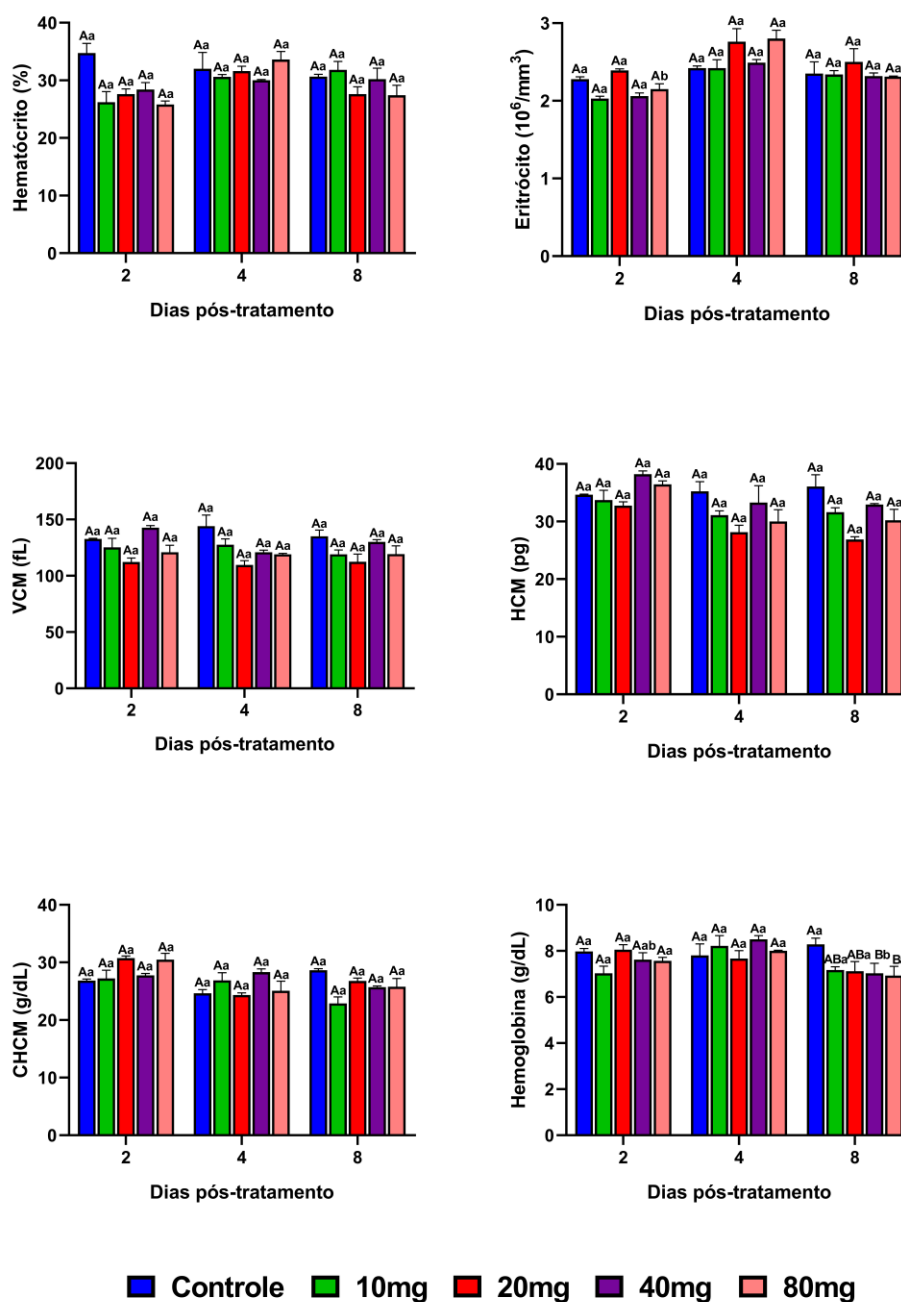


Figura 4. Análise hematológica das tilápias tratadas com Doxíciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

Na avaliação leucocitária (Figura 5), não se observou alterações significativas ($P \geq 0.05$) na contagem global de leucócitos entre os diferentes tratamentos. Verificou-se aumento significativo de linfócitos ($P < 0.05$) no segundo dia após o início do tratamento em animais

com 80 mg quando comparado a peixes tratados com 20 mg/kg, porém ambos não apresentaram variações significativas quando comparados às tilápias controles. A avaliação dos tratamentos ao longo do tempo revelou diminuição de monócitos e neutrófilos, no intervalo de 4 dias após tratamento com 80 mg de doxiciclina, os quais retornaram aos níveis normais no intervalo seguinte (8 dias de tratamento).

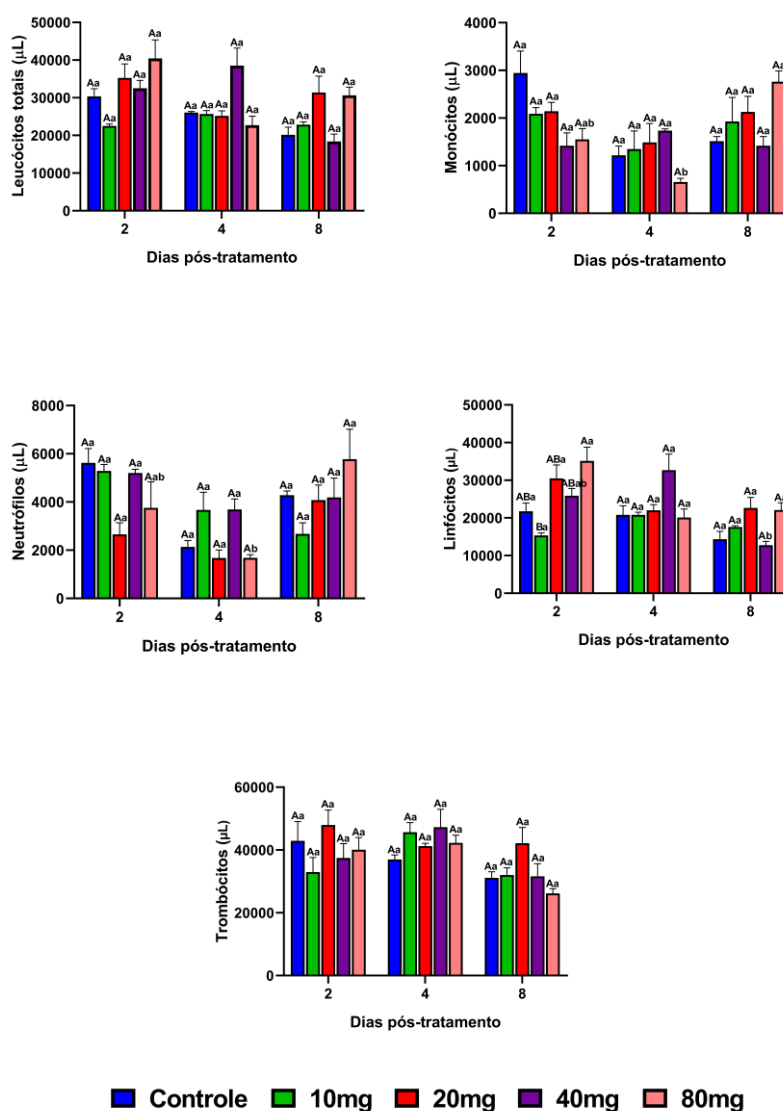


Figura 5. Análise leucocitária das tilápias tratadas com Doxiciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.3. Análise morfométrica de órgãos

Na análise somática de baço, fígado e rim não foi observado nenhuma alteração significativa nos animais dos diferentes tratamentos e também do grupo controle (Figura 6).

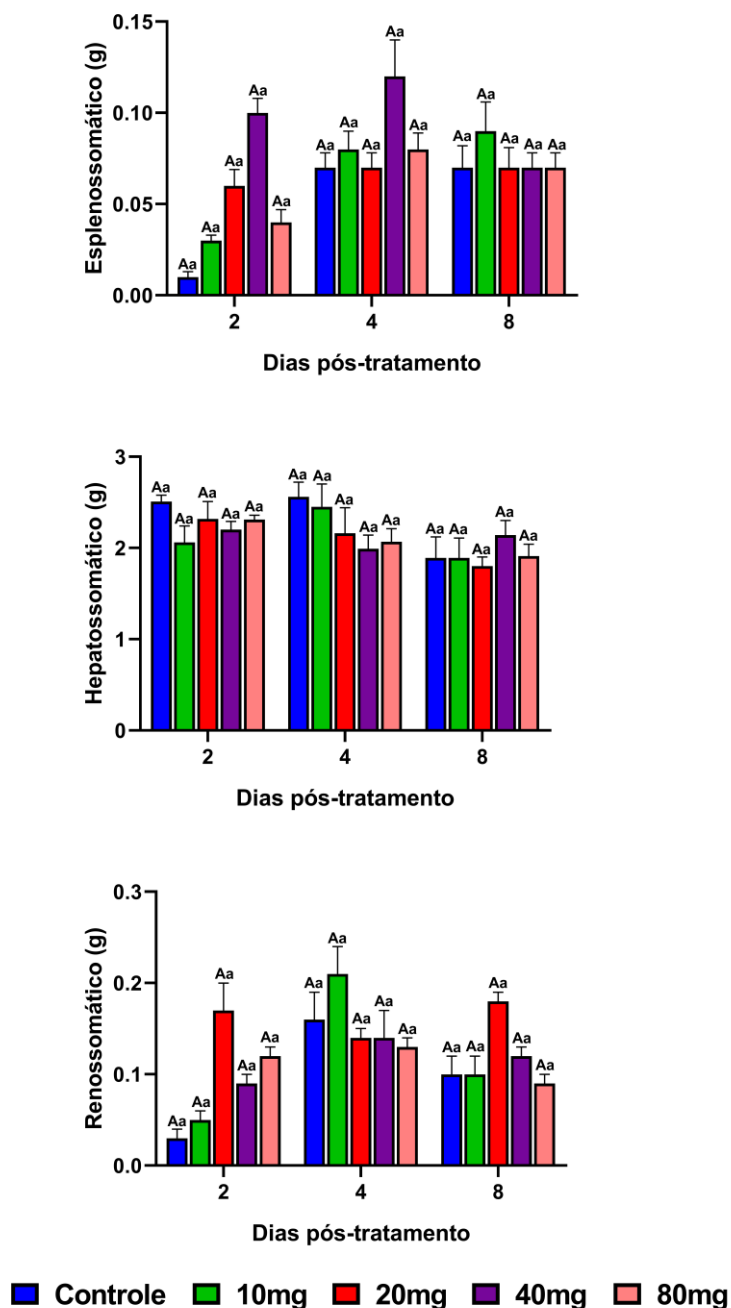


Figura 6. Avaliação somática de baço, fígado e rim das tilápias tratadas com Doxíciclina. Médias (n=5) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.4. Alterações histopatológicas

O estudo histopatológico de tilápias tratadas com doxiciclina apresentou alterações no fígado com perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presença de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação dos sinusoides hepáticos (Figura 7). Tais achados histopatológicos foram observados com maior frequência em animais tratados com 80 mg de doxiciclina. Os cortes histológicos dos tecidos esplênicos e renais não apresentaram alterações significativas quando comparados aos animais do grupo controle. Porém, vale ressaltar que estudos que visem quantificar e analisar comparativamente a formação de centro de melanomacrófagos nos tecidos esplênicos podem auxiliar na compreensão da participação dos mesmos durante o processo de desintoxicação do organismo.

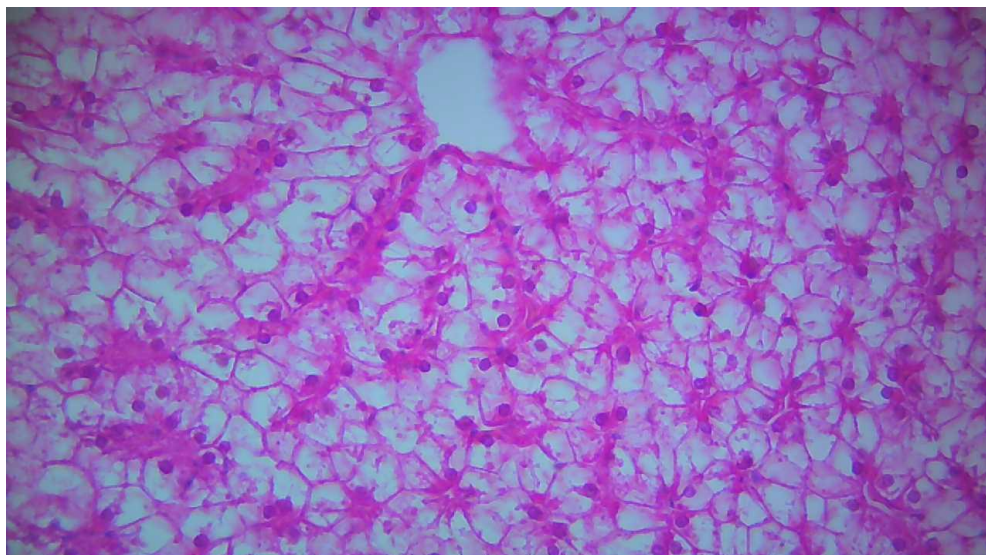


Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de tilápias tratadas com doxiciclina. Observa-se perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presenças de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação sinusóide hepática. Coloração H.E, aumento de 40x.

4. DISCUSSÃO

Em condições de surtos de doenças bacterianas, o uso de fármacos na aquicultura é indispensável, entretanto, há poucos antimicrobianos registrados para uso em peixes, o que proporciona seu uso indiscriminado (Carraschi, 2017). Em razão disso, se torna relevante o estudo da segurança clínica em peixes, que pode ser acessada através de testes hematológicos

e bioquímicos, nos quais são analisados parâmetros essenciais para avaliar a condição fisiológica dos peixes (Mahmoud et al. 2018) frente a utilização de fármacos na piscicultura.

Na avaliação hematológica das tilápias tratadas com doxiciclina não foram observadas alterações nos valores de hematócrito, VCM, HCM e CHCM, corroborando com os achados de Costa et al. (2022), demonstrando que as tilápias tratadas com zileuton não apresentaram nenhuma alteração entre as diferentes concentrações administradas do fármaco, durante reação inflamatória aguda ocasionada pela *Aeromonas hydrophila*, sugerindo a segurança clínica deste fármaco.

A hemoglobina pode indicar o conteúdo de oxigênio no sangue e em condições de estresse, pode ocorrer anóxia, cessando o mecanismo de fosforilação oxidativa, sendo a via alternativa de síntese de energia no organismo (Ramesh et al., 2018). No presente estudo, doses mais altas de doxiciclina (40 e 80 mg/kg) administrada por oito dias consecutivos diminuíram a concentração de hemoglobina. No entanto, não foram observadas evidências de anemia, por não ter sido observado diminuição nos valores circulantes de hemácias, bem como nos percentuais de hematócrito, sendo descartada a hipótese de que o tratamento com esta tetraciclina teria resultado em alterações hemolíticas. Feng et al. (2017) demonstraram que a doxiciclina se liga à cavidade hidrofóbica de hemoglobina bovina através de múltiplas interações em um mecanismo semelhante ao que ocorre de fármacos com a albumina. Engebretson e Hey-Hadavi (2011) e observaram diminuição de hemoglobina A1c durante o tratamento crônico com doxiciclina por três meses em pacientes com diabetes tipo-2. Para estes autores, as tetraciclinas podem inibir a glicação de proteínas não enzimáticas.

Efeitos semelhantes foram observados nas tilápias, uma vez que foi observada a diminuição dos valores circulantes de hemoglobina em peixes tratados com 80 mg de doxiciclina após oito dias de tratamento e tal diminuição apresentou relações significativas ao aumento da glicemia. O processamento metabólico da glicose (glicólise) é uma importante via de produção de ATP, fazendo com que a glicose possa ter seus níveis alterados no sangue quando o animal se encontra em alta exigência energética, sendo fortemente influenciados por catecolaminas, glicocorticoide e hormônios tireoidianos (Ramesh et al., 2018). Tilápias tratadas com 80 mg de doxiciclina apresentaram aumento transitório nos valores circulantes de albumina no quarto dia de tratamento, os quais retornaram aos valores basais no oitavo dia. A hiperalbuminemia geralmente decorre de alterações no equilíbrio líquido-eletrolítico, pois a perda de volume de líquidos do compartimento extracelular plasmático resulta em

hemoconcentração, refletindo no aumento sérico de albumina e este mecanismo está claramente descrito em mamíferos (Belo et al., 2012).

Existem poucos dados sobre a influência dos fármacos antibacterianos nos índices bioquímicos do soro de peixes e os que foram publicados até agora são principalmente focados nos efeitos da oxitetraciclina (Bojarski et al., 2020) havendo poucas informações sobre o uso doxíciclina em peixes. Na avaliação hepática, tilápias tratadas com 80 mg de doxíciclina oito dias consecutivos tiveram aumento dos níveis séricos de AST, assim como observado por Oyeniran et al. (2021) em que peixes tratados com diferentes antibióticos tiveram maiores atividades de AST em comparação com o controle, sugerindo alterações de citotoxicidade hepática. Bojarski et al. (2020) observaram um aumento de AST em peixes expostos à oxitetraciclina, possivelmente como resultado de efeito citotóxico transitório durante o tratamento com esta tetraciclina. O aumento da degradação metabólica desse fármaco nos hepatócitos pode resultar na produção de radicais livres que favorecem o aumento da peroxidação lipídica e consequentemente alterações na permeabilidade da membrana plasmática dos hepatócitos, podendo provocar extravasamento desta enzima, bem como, nos casos mais severos, pode causar citotoxicidade (Belo et al., 2012).

Os dados sobre a resposta hematológica e imunológica em peixes após o tratamento com antibióticos são complexos, pois os resultados obtidos por vários autores provavelmente dependem da dosagem de antibióticos, de processos infecciosos e da sensibilidade de várias espécies de peixes (Kondera et al., 2020).

Os leucócitos desempenham um papel vital no sistema imunológico dos peixes, compreendendo o elemento celular da imunidade inata e liberando substâncias humorais, como peptídeos antimicrobianos catiônicos, componentes do sistema complemento, lectinas e citocinas (Do Huu et al., 2016). De acordo com Poopal et al. (2017), a alteração no nível de leucócitos pode ser uma indicação de ativação da resposta imune. No presente estudo, não se observaram alterações no número de leucócitos circulantes durante o tratamento com esta tetraciclina, sugerindo a baixa toxicidade do tratamento da doxíciclina. A diminuição do número de monócitos e neutrófilos no quarto dia após tratamento com 80 mg de doxíciclina corrobora os achados de Maklakova et al., (2011) em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) tratadas com cinco doses de 20 mg/kg de oxitetraciclina.

Na análise somática de baço, fígado e rim não foi observado nenhuma alteração significativa nos animais dos diferentes tratamentos e grupo controle, estes resultados estão de

acordo com Moraes (2017), em que não detectaram diferença em relação ao peso do órgão peso do animal em estudo da segurança clínica da amoxicilina para o tratamento de estreptococose em tilápias do Nilo e, resultado similar também foi observado por Dobšíková et al. (2013) que avaliou a oxitetraciclina nos índices biométricos em carpa comum (*Cyprinus carpio* L.). Esses nossos achados corroboram com os resultados dos estudos eritrocitários, leucocitários e bioquímicos das tilápias, sugerindo que a droga não exerça um comprometimento mais acentuado das funções hepáticas e renais decorrentes de processos inflamatórios nestes tecidos.

Todos os peixes deste estudo, independente do tratamento recebido, não apresentaram nenhuma alteração comportamental e/ou clínica como natação errática, letargia, aumento do batimento opercular, lesão de pele ou perda de apetite durante o tratamento por oito dias com doxiciclina. Portanto, os resultados observados em seu conjunto demonstraram a segurança clínica do tratamento com doxiciclina administrada via oral nas doses 10, 20, 40 e 80 mg/ Kg de p.v., apesar de terem desenvolvido alterações transitórias na funcionalidade hepática terem sido observadas após oito dias de tratamento com a dose de 80mg/kg de doxiciclina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARACATI, M., RODRIGUES, L., OLIVEIRA, S., MORAES, A., PRADO, E., FERNANDES, D., ... BELO, M. Clinical safety of Zafirlukast treatment during acute inflammatory reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**, v. 37, n. 2, p. 67-73, 2021.
- BASSETTI, M.; RUSSO, A.; CARNELUTTI, A.; LA ROSA, A.; RIGHI, E. Antimicrobial resistance and treatment: an unmet clinical safety need. **Expert Opinion on Drug Safety**. v. 17, n. 7, p. 669-680, 2018.
- BELO, M.A.A. et al. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of Fish Biology**, v. 82, n. 4, p. 1403-1410, 2013.
- BELO, M.A.A.; MORAES, J. R. E.; SOARES, V. E.; MARTINS, 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, 2012.

- BOJARSKI, B.; KOT, B.; WITESKA, M. Antibacterials in aquatic environment and their toxicity to fish. **Pharmaceuticals**. v.13, n. 8, p. 189, 2020.
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. **Aquaculture Research**, v.32, p. 297-304, 2001.
- CARRASCHI, S. P.; FLORÊNCIO, T.; IGNÁCIO, N. F.; IKEFUTI, C. V.; CRUZ, C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematological and histopathological assessment of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after treatment of pathogens with veterinary medicinal products. **Comparative Clinical Pathology**. v. 26, n. 1, p. 105-114, 2017.
- COSTA, C.; OLIVEIRA, S.; ARACATI, M.; RODRIGUES, L.; COLTURATO, L.; MONTASSIER, H.; BELO, M. Clinical safety of treatment with zileuton, 5-lox inhibitor, during acute inflammatory reaction in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**. v. 38, n. 1, p. 23-30, 2022.
- DO HUU, H.; SANG, H. M.; THUY, N. T. T. Dietary β -glucan improved growth performance, *Vibrio* counts, haematological parameters and stress resistance of pompano fish, *Trachinotus ovatus* Linnaeus, 1758. **Fish & shellfish immunology**. v. 54, p. 402-410, 2016.
- DOBŠÍKOVÁ, R.; BLAHOVÁ, J.; MIKULÍKOVÁ, I.; MODRÁ, H.; PRÁŠKOVÁ, E.; SVOBODOVÁ, Z.; ... SIWICKI, A. K. The effect of oyster mushroom β -1.3/1.6-D-glucan and oxytetracycline antibiotic on biometrical, haematological, biochemical, and immunological indices, and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & shellfish immunology**. v. 35, n. 6, p. 1813-1823, 2013.
- ENGEBRETSON, S. P.; HEY-HADAVI, J. Sub-antimicrobial doxycycline for periodontitis reduces hemoglobin A1c in subjects with type 2 diabetes: a pilot study. **Pharmacological Research**. v. 64, n. 6, p. 624-629, 2011
- FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Approved aquaculture drugs. New Hampshire: U.S. Food and Drug Administration, 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs>
- HOLMES, Natasha E.; CHARLES, Patrick GP. Safety and efficacy review of doxycycline. *Clinical Medicine. Therapeutics*, v. 1, p. CMT. S2035, 2009.
- KONDERA, E., BOJARSKI, B., ŁUGOWSKA, K., KOT, B., & WITESKA, M. Effects of oxytetracycline and gentamicin therapeutic doses on hematological, biochemical and

- hematopoietic parameters in *Cyprinus carpio* Juveniles. **Animals**. v. 10, n. 12, p. 2278, 2020.
- MAHMOUD, S.; HASABELNABY, S.; HAMMAD, S.; SAKR, T. Antiviral nucleoside and nucleotide analogs: a review. **Journal of Advanced Pharmacy Research**. v. 2, n. 2, p. 73-88, 2018.
- MAKLAKOVA, M. E.; KONDRATIEVA, I. A.; MIKHAILOVA, E. S.; STUPIN, R. V.; KHAPCHAEV, S. H.; KASUMYAN, A. O. Effect of antibiotics on immunophysiological status and their taste attractiveness for rainbow trout *Parasalmo* (= *Oncorhynchus*) *mykiss* (*Salmoniformes*, *Salmonidae*). **Journal of Ichthyology**. v. 51, n. 11, p. 1133-1142, 2011.
- MORAES, A. C. Eficácia terapêutica, segurança clínica e ecotoxicológica da amoxicilina por via intramuscular para o tratamento de estreptococose em tilápias do Nilo. 2017. 87f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista - FCAV, Jaboticabal, 2017.
- 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.
- OLIVEIRA, S. L.; ARACATI, M. F.; RODRIGUES, L. F.; COSTA, C. C.; CONDE, G.; MORAES, A. C.; MANRIQUE, W. G.; CHARLIE-SILVA, I.; BELO, M. A. A. Clinical safety of zafirlukast treatment during a foreign body inflammatory reaction in Nile tilapias, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Development Research**. v.11, p. 47914-47919, 2021.
- OWENS, J. R.; ROBERT, C.; AMBROSE, P. G. Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. **Clinical infectious diseases**. v. 41, n. Supplement_2, p. S144-S157, 2005.
- OYENIRAN, D. O.; SOGBANMU, T. O.; ADESALU, T. A. Antibiotics, algal evaluations and subacute effects of abattoir wastewater on liver function enzymes, genetic and haematologic biomarkers in the freshwater fish, *Clarias gariepinus*. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 212, p. 111982, 2021.
- POOPAL, R. K.; RAMESH, M.; MARUTHAPPAN, V.; BABU RAJENDRAN, R. Potential effects of low molecular weight phthalate esters (C16H22O4 and C12H14O4) on the freshwater fish *Cyprinus carpio*. **Toxicology research**, v. 6, n. 4, p. 505-520, 2017.

- RAMESH, M.; THILAGAVATHI, T.; RATHIKA, R.; POOPAL, R. K. Antioxidant status, biochemical, and hematological responses in a cultivable fish *Cirrhinus mrigala* exposed to an aquaculture antibiotic Sulfamethazine. **Aquaculture**. v. 491, p. 10-19, 2018.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT software changes and enhancements through computer program**. Release 8.9.3. Cary: SAS Institute, 2012.
- SHARMA, S. K.; BHATT, P.; ASDAQ, S. M. B.; ALSHAMMARI, M. K.; ALANAZI, A.; ALRASHEEDI, N. S.; ... IMRAN, M. Combined therapy with ivermectin and doxycycline can effectively alleviate the cytokine storm of COVID-19 infection amid vaccination drive: A narrative review. **Journal of Infection and Public Health**, 2022.
- SMITH, K.; LEYDEN, J. J. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. **Clinical therapeutics**. v. 27, n. 9, p. 1329-1342, 2005.
- STECHMILLER, J.; COWAN, L.; SCHULTZ, G. The role of doxycycline as a matrix metalloproteinase inhibitor for the treatment of chronic wounds. **Biological research for nursing**. v. 11, n. 4, p. 336-344, 2010.
- VALENTÍN, S.; MORALES, A.; SÁNCHEZ, J. L.; RIVERA, A. Safety and efficacy of doxycycline in the treatment of rosacea. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**: CCID, v. 2, p. 129, 2009.
- WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, 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.

CAPÍTULO 3 – Avaliação da eficácia terapêutica da Doxíciclina em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tratadas via oral

Susana Luperini de Oliveira¹, Camila Carlino da Costa¹, Mayumi Fernanda Aracati¹, Leticia Franchin Rodrigues¹, Gabriel Conde¹, Romário Alves Rodrigues², Claudinei da Cruz³, Hélio José Montassier⁴

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

² Departamento de Microbiologia de alimentos, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

³ Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia do Agrotóxicos, UNIFEB, Barretos/SP.

⁴ Departamento de Patologia animal, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

Resumo - O presente estudo teve por objetivo avaliar a eficácia terapêutica da doxíciclina, administrada via oral incorporada à ração, para o tratamento de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) infectadas experimentalmente com *S. agalactiae* e *A. hydrophila* e também os efeitos desse tratamento sobre as respostas imunes humorais desses animais contra essas bactérias. Para tal, foram delineados dois ensaios experimentais e dois testes para estabelecimento da DL₅₀ (*S. agalactiae* e *A. hydrophila*). Ao todo foram utilizadas 320 tilápias, ± 100 g cada, acondicionadas em 32 tanques de 100L (n=10), sendo realizado a seguinte distribuição: 60 tilápias foram submetidos a testes para estabelecimento da DL₅₀, em que 30 tilápias (3 tanques, n=10) foram infectadas com diferentes concentrações de *A. hydrophila* ($1,24 \times 10^7$; $4,93 \times 10^6$ e $8,40 \times 10^5$ UFC/mL) e 30 tilápias para *S. agalactiae* ($3,60 \times 10^7$; $1,80 \times 10^7$ e $0,90 \times 10^6$ UFC/mL). Para os ensaios experimentais foi realizado a seguinte distribuição: 130 tilápias para desafio experimental com *S. agalactiae* e 130 tilápias para *A. hydrophila*, sendo constituído os seguintes tratamentos: *S. agalactiae* → S0 (controle, infecção e não tratado com Doxíciclina); S1, S2 e S3 (infecção e tratados com 20, 40 e 80mg/kg de p.v. de Doxíciclina, respectivamente) e PF (padrão fisiológico, valores de referências, sem tratamento e sem infecção, n=10); *A. hydrophila* → A0 (controle, infecção e não tratado com Doxíciclina); A1, A2 e A3 (infecção e tratados com 20, 40 e 80mg/kg de p.v. de Doxíciclina, respectivamente) e PF (padrão fisiológico, valores de referências, sem tratamento e sem infecção, n=10). Animais que sobreviveram ao estímulo infeccioso foram amostrados no 11º dia de infecção e 4 dias após o término do tratamento (15º dia) para avaliação de recuperação clínica e microbiológica. Foi coletado sangue para hemograma, leucograma, burst e mensuração de anticorpos anti-*S. agalactiae* e anti-*A. hydrophila*. Amostras de baço, fígado e rim cranial para avaliação histopatológica, além de cérebro e rim cranial para estudo microbiológico de reisolamento dos patógenos. Os estudos de eficácia terapêutica revelaram efeito dose-resposta para o controle da infecção experimental aos estímulos de DL50 para *S. agalactiae* e *A. hydrophila*, principalmente na dose de 80mg/kg, bem como na produção de anticorpos anti-*S. agalactiae* e anti-*A. hydrophila*, confirmando a hipótese de que a ação antimicrobiana da doxíciclina auxiliou os mecanismos de defesa das tilápias tratadas em ambos os estudos quando comparadas aos animais do grupo controle, sugerindo o potencial deste antimicrobiano para uso na tilapicultura, por apresentar eficácia terapêutica no controle de patógenos com significativa importância sanitária e econômica e exercer efeitos positivos sobre as respostas imunes humorais desses animais.

Palavras-chave: aeromonose, antimicrobiano, Elisa indireto, estreptococose, tetraciclina.

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são os compostos mais utilizados em todo o mundo para o tratamento de doenças em pisciculturas (Assane et al., 2019). São poucas as informações a respeito de estudos farmacológicos em peixes, além disto, é complexo a comparação entre os dados dos estudos, em consequência das diferenças nas condições experimentais, tais como, espécie de peixe, temperatura da água, salinidade, entre outros (Costa et al., 2022). Atualmente, existem poucos medicamentos aprovados pela Food US Food e Drug Administration (FDA) para uso em peixes (FDA, 2022). A otimização da dose é uma grande preocupação na piscicultura e demanda conhecimento de muitos parâmetros, incluindo farmacodinâmica e farmacocinética apropriada (Oliveira et al., 2021).

O cultivo intensivo de animais aquáticos para suprir a crescente demanda para consumo humano torna inevitável a ocorrência de diversas doenças bacterianas na aquicultura. Dentre as doenças bacterianas importantes, a ocorrência de estreptococose e septicemia por aeromonas têm sido apontadas como os maiores obstáculos para a indústria sustentável da tilápia (Nafiqoh et al., 2022).

Desta forma, estudos farmacológicos fornecem subsídios fundamentais para se tomar decisões terapêuticas que maximizem a eficácia, bem como a segurança clínica do tratamento e segurança ao consumidor, minimizando inclusive o impacto ambiental da terapia. Tal abordagem reduzirá o custo, o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana e o acúmulo de resíduos de drogas nos tecidos animais e no meio ambiente (Rigos e Smith, 2015).

A princípio, os antimicrobianos devem ser seguros para o hospedeiro e atingir a eficácia considerada para tratar doenças infecciosas bacterianas. Além de serem usados na medicina humana, são extremamente úteis na saúde animal, incluindo a aquicultura, sendo classificados como agentes terapêuticos, profiláticos e metafiláticos. Importante salientar que, em sistemas de produções de peixes, os antimicrobianos são frequentemente utilizados, por curtos períodos de tempo, em níveis terapêuticos por via oral (Gastalho e Ramos, 2014).

O uso indiscriminado da antibióticoterapia na aquicultura leva inevitavelmente ao surgimento de resistência nas bactérias alvo e à redução da eficácia deste método de controle da doença. Argumenta-se que uma melhor compreensão da etiologia das doenças dos animais aquáticos e o potencial dos antimicrobianos para controlar as perdas por doenças, tornam-se essenciais para alcançar um uso mais prudente destes compostos na terapêutica (Smith, 2012).

A doxiciclina é um derivado semissintético da tetraciclina, antimicrobiano altamente eficaz, barato e com um amplo espectro contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas aeróbias e anaeróbicas, *Rickettsias*, *Chlamydiae*, *Mycoplasmas* e alguns protozoários (Soliman et al., 2015). Além disso, as propriedades farmacocinéticas da doxiciclina são superiores quando comparadas as tetraciclinas mais antigas, possui lipofilicidade relativa mais alta, incluindo alta absorção oral, amplo volume de distribuição tecidual, meia-vida de eliminação mais longa e menor afinidade pelo cálcio (Sartini et al., 2021).

O estudo de eficácia da doxiciclina foi estabelecida em humanos (Cross et al., 2016) e diversas espécies animais, tais como, cães (Niwetpathomwat, 2006), gatos (Nochot et al., 2019), equinos (Zozaya et al., 2013), camundongos (Rajendran et al., 2018), frangos de corte (Soliman et al., 2015), gansos (Sartini et al., 2021), e poucas espécies de peixe, como bagre amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) e Carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), porém, poucos são os conhecimentos sobre a doxiciclina em tilápia do Nilo.

Tendo em vista a necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos para pisciculturas e a importância sócio econômica da Tilapicultura, este estudo teve por objetivo estudar a eficácia da doxiciclina frente a duas principais bacterioses de peixes, *Aeromonas hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*, bem como os possíveis efeitos desse antimicrobiano sobre as respostas imunes humorais contra essas bactérias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Peixes e acondicionamento

Para o estudo de eficácia terapêutica da Doxiciclina, foram utilizadas 320 tilápias do Nilo (sendo 130 animais para cada ensaio experimental, mais 30 tilápias para cada bacteriose para estabelecimento da DL_{50}) pesando em média 100g, oriundas da mesma desova, provenientes da fazenda Aquabel (Porto Ferreira, SP, Brasil). Os peixes foram distribuídos em 32 tanques (100L de água cada, $n=10$) abastecido com água corrente sem de cloro proveniente de poço artesiano com sistema de recirculação com vazão de 1L/min, dos quais seis tanques foram destinados ao estudo de determinação de DL_{50} (três tanques para cada microrganismo). Após serem transportados aos devidos tanques, os peixes foram aclimatados por 15 dias, tempo necessário para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltassem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banho

com solução de NaCl na concentração de 6,0g/L (Carneiro e Urbinati, 2001). Os animais receberam ração comercial extrusada com 36% de proteína bruta (Nutrapiscis® - Empresa Presence), constituindo a dieta basal. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, às 8h e às 17h, correspondendo a 2% da biomassa dos tanques. Os parâmetros de qualidade da água foram determinados duas vezes ao dia durante todo o período experimental utilizando pHmetro YSI-63 e oxímetro Y-55, e seus valores permaneceram dentro da faixa adequada para o bem-estar de peixes tropicais (Boyd, 1990) (oxigênio dissolvido = $4,07 \pm 0,89$ mg L⁻¹; temperatura = $27,64 \pm 2,05^{\circ}\text{C}$; pH = $7,64 \pm 0,54$; e condutividade = $208,29 \pm 97,57\mu\text{S/cm}$). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UNESP/FCAV sob protocolo nº 5315/20.

2.2. Design experimental

Para o estudo de eficácia de Doxíciclina, foi utilizado ao todo 32 tanques (100L de água cada, n=10), destes 32 tanques, 26 foram destinados aos desafios bacterianos experimentais, sendo que, 13 tanques foram utilizados para o estudo de *A. hydrophila* e 13 para *S. agalactiae*, conforme a Tabela 2:

Tabela 2. Distribuição das tilápias para avaliação da eficácia terapêutica.

Grupos	Eficácia terapêutica (Infecção experimental com <i>A. hydrophila</i>)	Repetições (totalizando 30 animais para cada grupo)		
		R1	R2	R3
A0	Controle (infectado e não tratado)	N=10	N=10	N=10
A1	Infectado e tratado com 20mg de Doxíciclina	N=10	N=10	N=10
A2	Infectado e tratado com 40mg de Doxíciclina	N=10	N=10	N=10
A3	Infectado e tratado com 80mg de Doxíciclina	N=10	N=10	N=10
A4	Padrão fisiológico (valor de referência)	N=10		
Grupos	Eficácia terapêutica (Infecção experimental com <i>S. agalactiae</i>)	Repetições (totalizando 30 animais para cada grupo)		
		R1	R2	R3
S0	Controle (infectado e não tratado)	N=10	N=10	N=10
S1	Infectado e tratado com 20mg de Doxíciclina	N=10	N=10	N=10
S2	Infectado e tratado com 40mg de Doxíciclina	N=10	N=10	N=10
S3	Infectado e tratado com 80mg de Doxíciclina	N=10	N=10	N=10
S4	Padrão fisiológico (valor de referência)	N=10		

Para todos os animais submetidos à administração de Doxiciclina (A1, A2, A3, S1, S2, S3) iniciou-se este tratamento 1 dia antes da inoculação de cada um dos dois patógenos bacterianos. Foram coletados metade dos animais sobreviventes ao desafio infeccioso após 11 dias dessas infecções experimentais. Em seguida, os animais restantes foram tratados apenas com ração comercial (sem óleo e sem Doxiciclina) até o 15º dia, portanto sendo este período denominado período de recuperação (4 dias). Foram coletadas amostras de sangue para determinação do hemograma, leucograma, burst e dosagem de anticorpos circulantes no soro sanguíneo; órgãos como baço, fígado e rim cranial para avaliação histopatológica; cérebro e rim caudal para isolamento da bactéria inoculada no animal.

Os 6 tanques restantes, foram destinados à determinação da DL₅₀ de cada bacteriose, ou seja, 3 tanques para *A. hydrophila* e 3 tanques para *S. agalactiae*, conforme Tabela 3:

Tabela 3. Distribuição das tilápias para determinação da DL₅₀ de cada bacteriose.

Grupos	Dose letal (DL ₅₀) (Infecção experimental com <i>A. hydrophila</i>)	Número de animais avaliados por 15 dias para DL ₅₀
DL ₅₀ 1	1,24x10 ⁷ UFC/mL	N= 10
DL ₅₀ 2	4,93x10 ⁶ UFC/mL	N= 10
DL ₅₀ 3	8,40x10 ⁵ UFC/mL	N= 10
Grupos	Dose letal (DL ₅₀) (Infecção experimental com <i>S. agalactiae</i>)	Número de animais avaliados por 15 dias para DL ₅₀
DL ₅₀ 1	3,60x10 ⁷ UFC/mL	N= 10
DL ₅₀ 2	1,80x10 ⁷ UFC/mL	N= 10
DL ₅₀ 3	0,90x10 ⁶ UFC/mL	N= 10

2.3. Dieta experimental

A ração comercial extrusada, contendo 36% de proteína bruta, umidade de 12%, extrato etéreo de 70 g/kg, matéria mineral de 140 g/kg, fibra bruta de 50 g/kg, cálcio de 25 g/kg, fósforo de 8 g/kg e vitamina C de 350 mg/kg. (Nutripiscis® - Empresa Presence) foi utilizada para compor as dietas experimentais das tilápias submetidas aos protocolos experimentais. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia (8h e 17h), com administração de 2% da biomassa dos tanques. A Doxiciclina utilizada foi da Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda., tendo sido enviada para farmácia de manipulação “DermoFlora” em Jaboticabal/SP que preparou cápsulas de 20 mg cada uma.

Para o preparo das dietas, diariamente a ração foi pesada proporcionalmente ao peso médio das tilápias de cada tanque. Em seguida, foram determinadas as doses de 20, 40 e 80mg de doxiciclina/kg p.v., compondo as dietas de A1/S1, A2/S2 e A3/S3 respectivamente, as quais foram previamente homogeneizadas em 2% de óleo vegetal, para depois serem misturadas na ração. Para padronização das dietas e balanço nutricional, foi adicionado 2% de óleo vegetal à dieta do grupo controle (A0 e S0).

2.4. Anestesia dos peixes

As tilápias foram anestesiadas por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para coleta de sangue e 1:500 no momento da eutanásia. A benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando o volume para 1L (Wedemeyer, 1970). Inicialmente foi realizado pré-anestesia, procedimento este que o nível de água dos tanques era reduzido até um volume de 10L adicionando-se 0,1g de benzocaína já diluída em álcool 98°. Logo após, cada peixe era transferido para um recipiente contendo 1L de água com 0,1g de benzocaína, ambos os procedimentos eram realizados com aeração para minimizar estresse ocasionado pela manipulação. Logo que o opérculo parava de se movimentar, o peixe era retirado e realizada a coleta de sangue. Por fim, o animal era transferido para outro recipiente contendo 0,5g de benzocaína diluída em 1L de água para eutanásia.

2.5. Produção dos inóculos de *A. hydrophila* e *S. agalactiae*

2.5.1. *Aeromonas hydrophila*

A cepa de *A. hydrophila* (GenBank accession number: MH305534.1) utilizada neste trabalho foi mantida congelada em freezer -80°C e no momento do uso, uma alíquota foi descongelada e o material colocado em 400mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco), homogeneizado e mantidos em estufa por 24h à 28°C para o crescimento da bactéria. Após seu crescimento, foram preparadas as diluições seriadas da suspensão dessa bactéria em água peptonada (0,1%) e as diluições foram semeadas as diluições em placas de petri contendo Tryptic Soy Agar (TSA), através do método por superfície, e mantidos em incubação por 24h à 28°C. Na etapa seguinte, foi realizada a contagem das colônias em placa e os resultados foram expressos em UFC/ml da suspensão bacteriana. Através de vários testes pilotos, a DL_{50} foi definida em $8,43 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹, com isso foi realizado o mesmo procedimento descrito

acima, para chegar na concentração estabelecida. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos e a 4°C, em centrífuga clínica refrigerada, desprezando-se o sobrenadante e a massa bacteriana sedimentada foi diluída ou concentrada em PBS esterilizado, obtendo então a concentração desejada em termos de DL₅₀, e imediatamente foi realizada a inoculação nos animais. No estabelecimento da DL₅₀ (dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais) utilizaram-se concentrações de 10³-10¹⁵ UFC por peixe.

2.5.2. *Streptococcus agalactiae*

A cepa de *S. agalactiae* (GenBank access number: MH359095.1) utilizada neste trabalho foi mantida congelada em freezer -80°C e no momento do uso, uma alíquota foi descongelada e o material colocado em 200mL de caldo Brain Heart Infusion broth (BHI broth), homogeneizado e mantidas em estufa por 48h à 35°C para o crescimento da bactéria. Após seu crescimento, foram preparadas as diluições seriadas da suspensão dessa bactéria em água peptonada (0,1%) e as diluições foram semeadas em placas de petri contendo Brain Heart Infusion Agar (BHI ágar), através do método por superfície, e mantidos em incubação por 48h à 35°C. Na etapa seguinte, foi realizada a contagem de colônias em placa e os resultados foram expressos em UFC/ml da suspensão bacteriana. Através de vários testes pilotos, a DL₅₀ foi definido em 1,1x10⁶ UFC/mL⁻¹, com isso foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, para chegar na concentração estabelecida. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos e a 4°C, em centrífuga clínica refrigerada, desprezando-se o sobrenadante e a massa bacteriana sedimentada foi diluída ou concentrada em PBS esterilizado, obtendo então a concentração desejada em termos de DL₅₀, e imediatamente foi realizada a inoculação nos animais. No estabelecimento da DL₅₀ (dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais) utilizaram-se concentrações de 10³-10¹⁵ UFC por peixe.

2.6. Determinação da concentração bacteriana letal (DL50)

2.6.1. *Aeromonas hydrophila*

Para a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (DL₅₀) e consequente determinação do inóculo de *A. hydrophila*, foram utilizados três tanques, com 10

peixes cada (n=30), com peso médio de 100g. Os peixes das caixas 1, 2 e 3 foram inoculados com as concentrações $1,24 \times 10^7$; $4,93 \times 10^6$ e $8,40 \times 10^5$ UFC/mL de *A. hydrophila*. Após 15 dias os resultados da mortalidade diária foram submetidos à análise estatística pelo programa estatístico Spearman-Kärber, (US EPA, Washington, DC, EUA), e a DL_{50} determinada foi de $8,43 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

2.6.2. *Streptococcus agalactiae*

O mesmo procedimento foi realizado para a determinação da concentração bacteriana letal para 50,0% dos peixes (DL_{50}) e consequente determinação do inóculo de *S. agalactiae*. Para isso foram utilizados três tanques, com 10 peixes cada (n=30), com peso médio de 100g, em que foram inoculados com as concentrações $3,6 \times 10^7$; $1,8 \times 10^7$ e $0,9 \times 10^6$ UFC/mL de *S. agalactiae*. Após 15 dias os resultados da mortalidade diária foram submetidos à análise estatística pelo programa estatístico Spearman-Kärber, (US EPA, Washington, DC, EUA), e a DL_{50} determinada foi de $1,1 \times 10^6$ UFC mL⁻¹.

2.7. Infecção experimental

Após a determinação da DL_{50} , foi realizada a inoculação nos grupos experimentais correspondentes por via intraperitoneal. Os sedimentos bacterianos foram diluídos em PBS estéril de modo a conter $8,43 \times 10^6$ para *A. hydrophila* e $1,1 \times 10^6$ para *S. agalactiae*. Com as soluções mantidas em gelo, alíquotas de 0,5 mL foram transferidas para seringas de 1 mL e administradas por via intraperitoneal nas tilápias, tendo sido realizadas a devida antissepsia com álcool antes do procedimento e, logo em seguida, foi administrado o inóculo na cavidade intraperitoneal.

2.8. Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC)

A dose do antimicrobiano Doxiciclina a ser preconizada inicialmente foi de 20mg/kg conforme descrito por Nakamura (1982). No entanto, foram realizados exames anteriores aos ensaios para determinação do MIC (concentração inibitória mínima) nas cepas bacterianas a serem avaliadas, assim preconizando a dose terapêutica correta para o estudo. As

concentrações de doxiciclina estabelecidas para a diluição seriada eram de 80mg à 0,001mg. A determinação do TSA (Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos) foi realizada pelo método de macrodiluição em tubos de acordo com a CLSI (2014). Esta técnica envolve a preparação de diluições seriadas e logarítmicas de antimicrobianos em um meio de cultura líquido (Mueller-Hinton), o qual permitirá o crescimento bacteriano. Inicialmente, uma bateria de tubos com as concentrações do antimicrobiano em teste é preparada. Ela é composta de tubos contendo as concentrações do agente antimicrobiano e o meio de cultura, em um volume final de 2 mL por tubo, incluindo um tubo para controle positivo (sem antimicrobiano) e um tubo para controle negativo (sem bactéria).

Os tubos contendo antimicrobianos foram inoculados com uma suspensão bacteriana padronizada em torno de 5×10^5 UFC/mL. Após o período de incubação de 24h a 28°C para *A. hydrophila* e 48h a 35°C para *S. agalactiae*, os tubos foram inspecionados visualmente para evidenciar o crescimento bacteriano, expresso pela turbidez. Nesta técnica, um tubo límpido demonstra que o crescimento bacteriano foi inibido, sendo que o primeiro tubo límpido representa a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. A CIM é expressa em microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$).

2.9. Teste de sensibilidade à doxiciclina (Disco de difusão)

2.9.1. *Aeromonas hydrophila*

O teste de sensibilidade ao antimicrobiano foi realizado com base as normas CLSI (2019), em que primeiramente, um “swab” de algodão estéril foi mergulhado na suspensão ajustada, girando-o várias vezes e apertando firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para que ajude a retirar o excesso de inóculo do swab. Em seguida, o “swab” foi passado sob a superfície estéril da placa de ágar Mueller-Hinton, de forma que a distribuição do inóculo seja uniforme por toda a placa. O disco antimicrobiano de 30 μg Doxiciclina foi colocado na superfície de uma placa de ágar semeada. O disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. As placas foram colocadas de forma invertida em uma estufa, a 28° C por 24 horas após a aplicação dos discos. Após período de incubação, foi realizado a análise do diâmetro do halo de inibição total (área sem crescimento) a olho nu. Com o auxílio de um paquímetro, o halo foi medido

em milímetros, encostando na parte de trás da placa de petri invertida. O tamanho do halo de inibição foi classificado como organismo sensível, indeterminado ou resistente à doxiciclina.

2.9.2. *Streptococcus agalactiae*

O teste de sensibilidade à doxiciclina foi realizado com base as normas CLSI (2019), em que com auxílio de um “swab” estéril, a suspensão ajustada foi passada sob a superfície estéril da placa de ágar Müeller-Hinton, de forma que a distribuição do inóculo seja uniforme por toda a placa. O disco antimicrobiano de 30µg Doxiciclina foi colocado na superfície de uma placa de ágar semeada. O disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. As placas foram colocadas de forma invertida em uma estufa, a 35° C, por 48 horas após a aplicação dos discos. Após período de incubação, foi realizado a análise do diâmetro do halo de inibição total (área sem crescimento) a olho nu. Com o auxílio de um paquímetro, o halo foi medido em milímetros, encostando na parte de trás da placa de petri invertida. O tamanho do halo de inibição foi classificado como organismo sensível, indeterminado ou resistente à doxiciclina.

2.10. Avaliação clínica e comportamental

Diariamente, foi desligado o sistema de aeração e os animais eram examinados nos tanques quanto ao eventual aparecimento de alterações comportamentais, sinais clínicos e mortalidade que pudessem resultar do tratamento com a doxiciclina ou do desafio bacteriano. Assim sendo, excitabilidade, letargia, frequência respiratória alterada (batimento opercular), desorientação, hemorragias cutâneas, corrosão de nadadeira, ulcerações oculares, exoftalmia, distensão abdominal, alteração na pigmentação dos tecidos, entre outros, eram avaliados e planilhados.

2.11. Avaliação hematológica

Peixes sobreviventes aos desafios bacterianos, após serem anestesiados, foram submetidos à coleta de 2 mL de sangue pelo vaso caudal de cada animal no 11º (último dia de tratamento) e no 15º dia pós-infecção. O sangue foi aliqotado em dois conjuntos: uma seringa revestida de heparina (5000 UI) e outra sem heparina, para obtenção de plasma e soro, respectivamente. Durante a troca de seringas (com e sem heparina), não era retirada a agulha do vaso sanguíneo

puncionado, para que não se tenha perda de sangue. O hemograma foi realizado por contagem em hemocítômetro (câmara de Neubauer) e usando-se a solução de Natt e Herrick (1952) na proporção 1:100 v:v). O hematócrito foi determinado pela técnica de centrifugação do microhematócrito. Já, para determinar os níveis de hemoglobina circulante, utilizando-se reagente da LabTest para leitura em comprimento de onda de 540nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo $VCM = (HT/HE) \cdot 100$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $CHCM = (HG/HT) \cdot 100$. Ainda, as contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em extensões sanguíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald Giensa Wright (Belo et al., 2013).

2.12. Avaliação histopatológica dos órgãos

No 11º e 15º dias após a inoculação das bactérias e depois de ter sido feito a coleta de sangue (item 2.11), as tilápias foram submetidas a eutanásia por imersão em solução aquosa de benzocaína (1:500) até o aprofundamento do plano anestésico e perda completa dos movimentos operculares. Em seguida, esses peixes foram dissecadas assepticamente próximo ao bico de Bunsen, por um corte longitudinal ventral, do ânus ao opérculo; outro do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral. Esta dissecação permitiu ampla visão de todos os órgãos. Para os exames histopatológicos foram coletadas amostras e avaliados fígado, baço e rim cranial. Imediatamente após coletar um fragmento de cada órgão, estes foram fixados em formol a 10% e após 24 horas os mesmos foram transferidos para o álcool 70%, sendo então direcionados para o preparo das peças no laboratório de patologia veterinária, no qual foram emblocados em parafina e cortes em espessura de aproximadamente 5µm para serem corados em hematoxilina e eosina. A leitura foi realizada em microscópio óptico para determinação de possíveis alterações patológicas.

2.13. Reisolamento dos patógenos

Amostras de cérebro e rim caudal dos peixes foram coletadas de forma asséptica próximo ao bico de Bunsen (conforme item 2.12), lavadas com água destilada estéril e homogeneizados em água peptonada a 0,1%.

Na etapa seguinte, 1mL da amostra foi adicionada em meio Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco), homogeneizado e esta mistura foi incubada por 24 horas à 28°C para animais desafiados com *A. hydrophila* e em caldo Brain Heart Infusion broth (BHI broth), por 48 horas a 35°C para animais desafiados com *S. agalactiae*. Após os respectivos períodos de crescimentos, foram semeados em ágar TSA e BHI respectivamente, tendo sido mantidos em incubação, nas condições referidas acima para cada uma dessas bactérias, para posteriormente ser realizada a contagem de colônias.

2.14. Determinação da concentração de anticorpos por método de Elisa indireto

Para quantificar/detectar os anticorpos de tilápia específicos para *A. hydrophila*, primeiramente ½ placa foi sensibilizada (Coatting) com a suspensão antigênica de *A. hydrophila*, já para anticorpos de tilápia específicos para *S. agalactiae* ½ placa foi sensibilizada (Coatting) com a suspensão antigênica de *S. agalactiae*. Ambas suspensões antigênicas bacterianas foram diluídas em tampão carbonato de sódio (pH 9,6), em uma diluição de 1/1000, adicionando-se 100µL/cavidade e incubando-se a microplaca over night a 4°C. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens da placa inteira com 0,05% Tween 20 em PBS pH 7,2 – 7,4 (300 µL/cavidade). Para o bloqueio as superfície das cavidades da microplaca, adicionou-se 1% BSA – 5% Sacarose diluídos em PBS (200 µL/cavidade), incubando-se por 1h à 37°C. Após esse período, foram realizadas 4 lavagens com PBS pH 7,2 – 7,4 acrescido de 0,05% Tween 20 (300 µL/cavidade) para posteriormente serem adicionadas as amostras de soro sanguíneo dos peixes experimentalmente infectados ou dos grupos controle. Para isso, as amostras séricas foram diluídas em PBS/Tween 20 a 0,05% e 1% de BSA em (1/10), 100 µL/cavidade por 2h em 37°C. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens das microplacas como foi anteriormente descrito. O anticorpo primário constituído de IgG produzida em Coelhos anti-IgM Tilápia (Clissa et al., 2021), foi diluído em 1% BSA em PBS/Tween 0,05% (1/1000) e adicionado 100 µL/cavidade e mantido por 1h em 37°C. Após esse período, foi realizado 4 lavagens da placa em 0,05% Tween 20 em PBS pH 7,2 – 7,4 (300 µL/poço). O anticorpo secundário (anticorpo conjugado → Anti-Rabbit IgG com a Peroxidase (Sigma)) foi preparado na sua diluição recomendada (1/2000) em PBS/Tween 20 a 0,05% e 1% de BSA e adicionado nas cavidades da microplaca em um volume de 100 µL/cavidade incubando-o por 1h em 37°C. Em seguida, foi realizado 4 lavagens da placa em 0,05% Tween 20 em PBS pH 7,2 –

7,4 (300 µL/poço). Em seguida foi adicionado o substrato (100 µL/poço) de TMB e mantido por 25 minutos no escuro. Para a revelação, após esse período, foi adicionado 50 µL/poço H₂SO₄ 30% e em seguida realizado a leitura em D.O. 450nm.

2.15. Análise estatística

O desenho experimental para avaliação da eficácia terapêutica foi inteiramente randomizado em esquema fatorial 5 x 2 (cinco tratamentos: 20, 40, 80, controle e padrão fisiológico X dois períodos de avaliação: 12 e 16 dias após desafio). As análises de variância para comparar os diferentes grupos experimentais foram realizadas utilizando o procedimento GLM (General Linear Model) do programa SAS, versão 9.3 (Statistical Analysis Software, 2012). Diferenças significativas ($P < 0.05$) foram estimadas com base no teste de Tukey ao nível de confiança de 95%.

O modelo de Kaplan-Meier foi utilizado para calcular a probabilidade de sobrevivência específica em função do tempo de Tilápias do Nilo tratadas ou não e submetidas a infecção experimental com *S. agalactiae* e *A. hydrophila*. As mortes foram atribuídas como 1 e os sobreviventes como 0, sendo observado a cada 24 horas. As diferenças entre as curvas dos tratamentos com doxiciclina (20, 40 e 80 mg) foram testadas quanto à significância pelo teste log-rank, com nível de significância de $P < 0.05$. Os dados foram analisados utilizando GraphPad Prism 6.

3. RESULTADOS

3.1. *Aeromonas hydrophila*

3.1.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC)

A determinação do teste de concentração mínima inibitória da doxiciclina para *A. hydrophila* revelou 5 µg/mL como a quantidade mínima desta tetraciclina para inibir o crescimento deste microrganismo.

3.1.2. Teste antibiograma

A interpretação do tamanho do halo formado para *A. hydrophila* em disco com 30µg de Doxiciclina de acordo com CLSI: Resistente: ≤ 10 ; Indeterminado: 11-13 e Sensível: ≥ 14 . Resultado obtido foi de 18mm, sendo classificado como sensível a Doxiciclina.

3.1.3. Avaliação clínica e comportamental

Peixes doentes (não tratados com doxiciclina) e tratados com a menor dose (20mg), exibiram sinais típicos de aeromonose principalmente entre 48 e 96 horas após a inoculação, incluindo exoftalmia, erosão de nadadeiras, septicemia hemorrágica, opacidade da córnea e ascite. Nenhum sinal clínico foi observado nos animais tratados com 40 e 80mg de doxiciclina.

3.1.4. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier

Os peixes tratados com doxiciclina (20, 40 e 80 mg) submetidos ao desafio com *A. hydrophila* apresentaram mortalidade significativamente menor ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle (Figura 8). As tilápias do grupo controle apresentaram razão de risco de mortalidade de 2,95 (1,22; 6,91), 4,53 (1,83; 11,17) e 8,52 (3,11; 23,36) maior comparado aos tratamentos 20, 40 e 80 mg respectivamente. Ainda, as tilápias tratadas com 20 mg apresentaram significativamente mais morte ($p < 0.05$) e risco de morte 6,65 (1,51; 29,31) maior quando comparadas as tilápias que receberam 80 mg de doxiciclina.

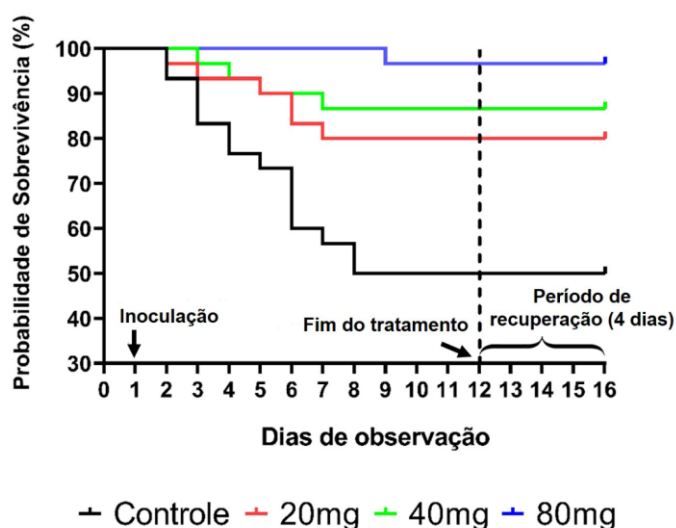


Figura 8. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para *Aeromonas hydrophila*.

A Tabela 4 apresenta o percentual relativo de sobrevivência (RPS) das tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com doxiciclina. Verificou-se efeito dose-resposta ao tratamento com esta tetraciclina com RPS de 60, 73,3 e 93,3% dos tratamentos com 20, 40 e 80 mg/kg de p.v. quando comparado aos animais controles.

Tabela 4. Percentual relativo de sobrevivência das tilápias infectadas com *A. hydrophila* e tratadas com diferentes doses de doxiciclina.

Tratamento	Número de animais mortos	Mortalidade (%)	Percentual relativo de sobrevivência (RPS) ¹
Controle	15 (30)	50	.
20 mg de doxiciclina	6 (30)	20	60
40 mg de doxiciclina	4 (30)	13,3	73,3
80 mg de doxiciclina	1 (30)	3,33	93,3

¹ Porcentagem relativa de sobrevivência (RPS), calculada pela equação: $RPS = [1 - (\% \text{ mortalidade do grupo tratado} / \% \text{ mortalidade do grupo controle})] \times 100$

3.1.5. Análise hematológica

Os animais do grupo controle tiveram aumento de hematócrito e eritrócito quando comparado aos animais tratados com doxiciclina e padrão fisiológico (Figura 9). Na avaliação do VCM e HCM animais submetidos ao tratamento com 80 e 40 mg apresentaram diminuição em relação as tilápias tratadas com 20 mg, mantendo essa relação mesmo após 4 dias de recuperação.

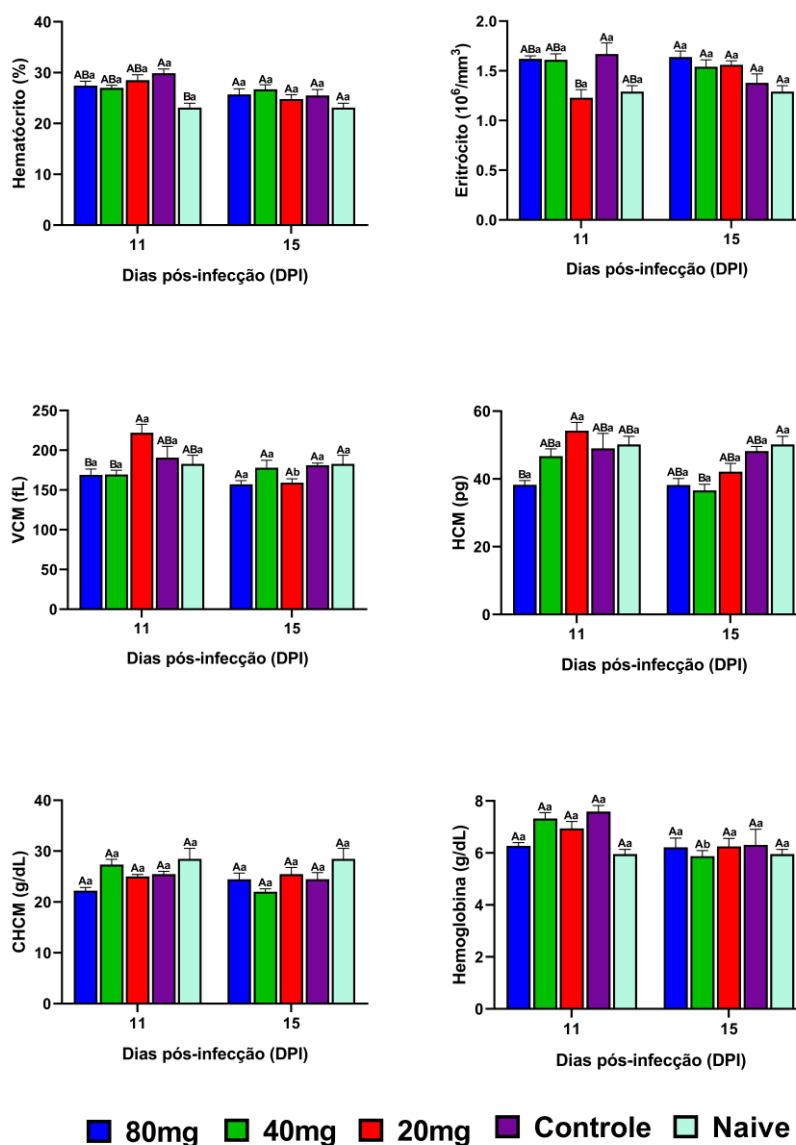


Figura 9. Análise sanguínea de tilápias após tratamento com Doxíciclina e desafiadas com *A. hydrophila*. Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P<0.05). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

Na avaliação leucocitária, foi observado aumento de leucócitos totais por influência de linfocitose associado a trombocitose em todos os grupos 8 dias após desafio quando comparado ao padrão fisiológico (Figura 10). Entretanto, no período de recuperação, todos os grupos tiveram diminuição de seus valores referentes aos leucócitos. Nos animais tratados com doxiciclina foi observado monocitopenia 11 dias após desafio bacteriano quando

comparado ao grupo controle. Foi observado também neutropenia em todos os grupos no período de recuperação (15 dias) quando comparado ao padrão fisiológico.

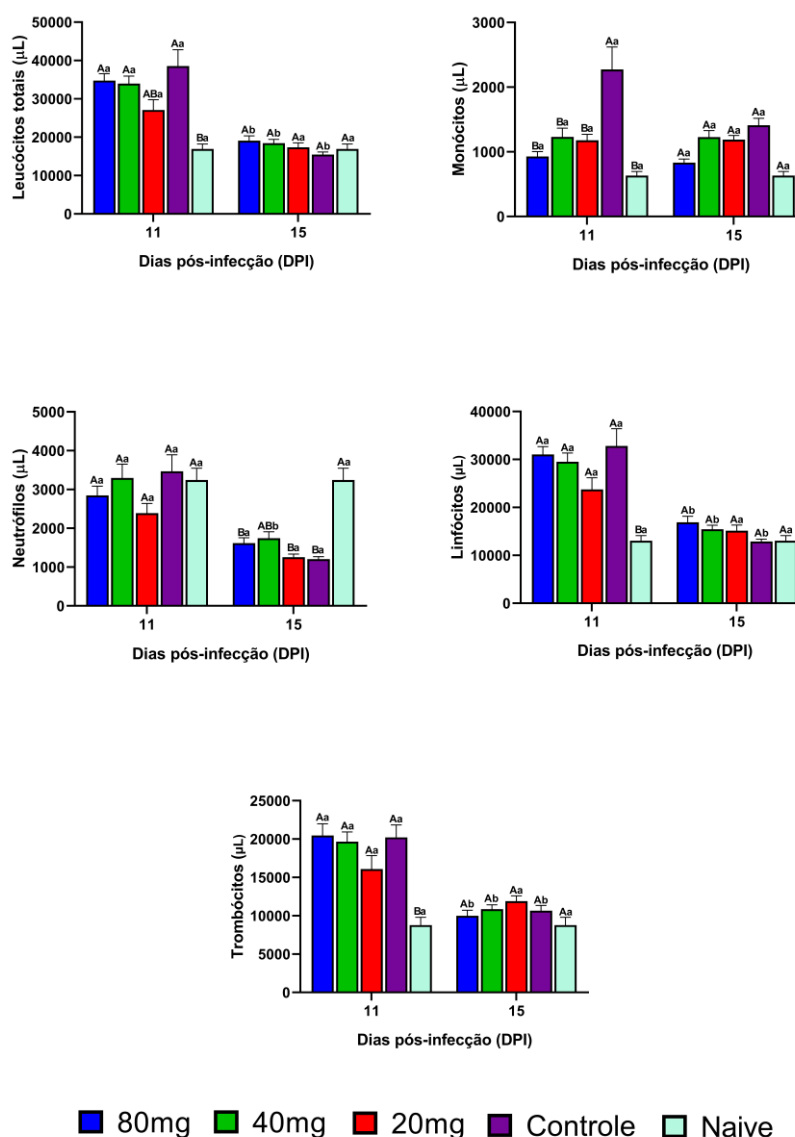


Figura 10. Análise leucocitária de tilápias após tratamento com Doxiciclina e desafiadas com *A. hydrophila*. Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.1.6. Burst respiratório leucocitário

As análises de produção de reativos de oxigênio (ROS) apresentaram diminuição significativa ($P < 0.05$) em todos os grupos tratados com doxiciclina quando comparados aos

peixes do grupo controle, principalmente na dose de 80 mg, assemelhando-se aos valores observados no padrão fisiológico (Figura 11).

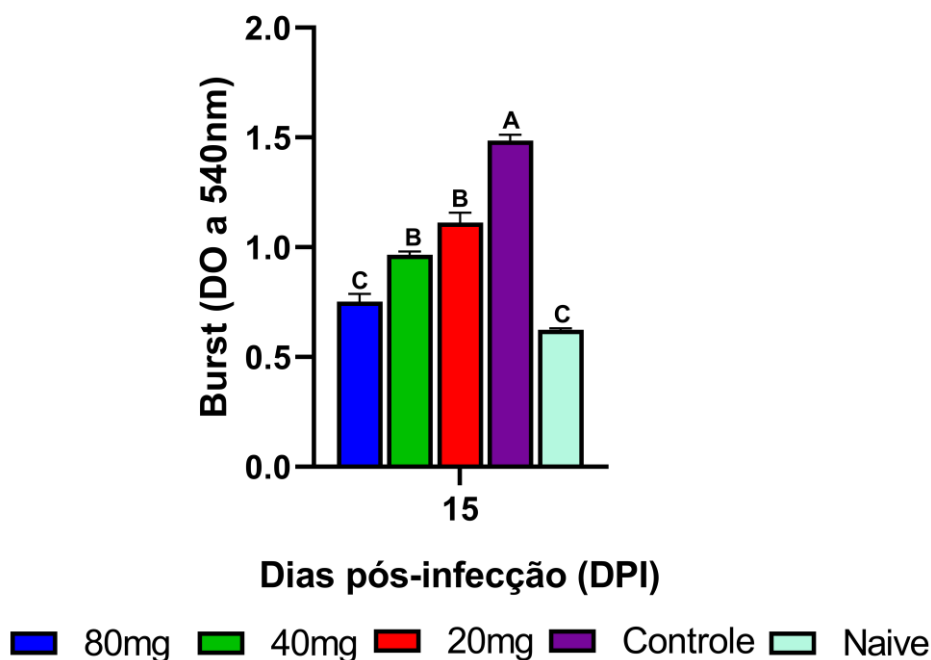


Figura 11. Valores médios observados na determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) para tilápias inoculadas *Aeromonas hydrophila* e tratadas com diferentes doses de doxiciclina 15 dias após a inoculação (período de recuperação). Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos.

3.1.7. Mensuração de anticorpos por métodos Elisa indireto

Na avaliação da mensuração de anticorpos, foram observados níveis estatisticamente superiores ($P < 0.05$) nos animais tratados com a dose mais elevada de doxiciclina (80mg) após 11 dias do desafio bacteriano, quando comparado aos demais grupos experimentais do presente estudo. Já no período de recuperação (15 dias), essa resposta foi intensificada nos animais tratados com 80mg de doxiciclina quando comparados aos animais do grupo controle (padrão fisiológico) (Figura 12).

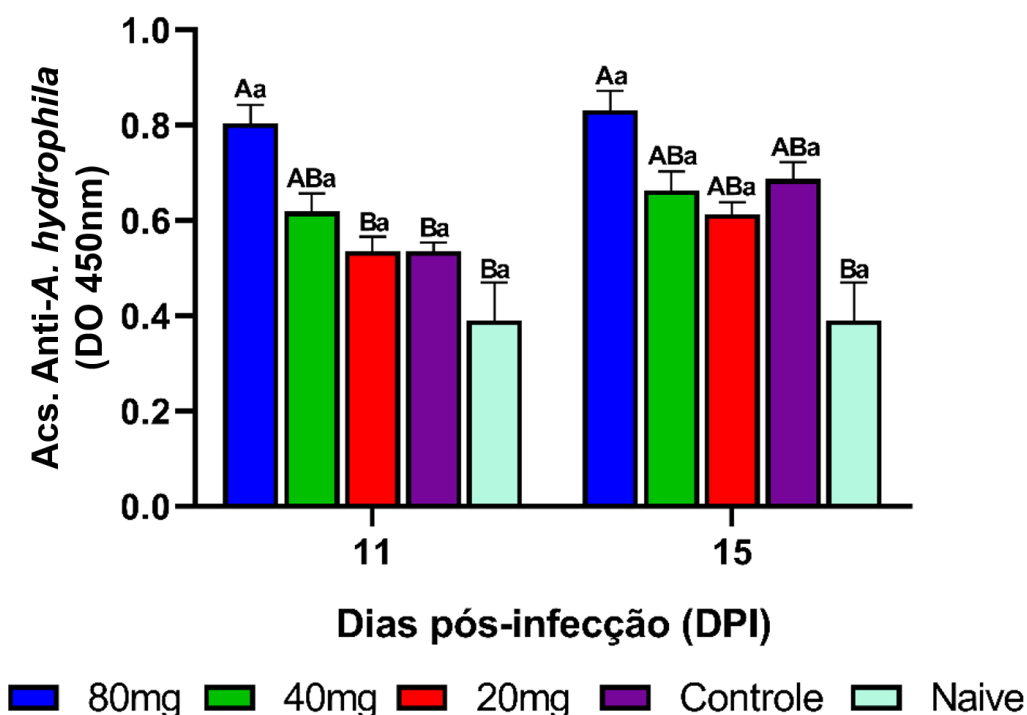


Figura 12. Valores médios de anticorpos contra *A. hydrophila*, mensurados como densidades ópticas determinadas por ELISA indireto em tilápias desafiadas com *A. hydrophila* e tratadas com doxiciclina. Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.1.8. Alterações histopatológicas

O estudo histopatológico das tilápias inoculadas com *A. hydrophila* apresentou alterações no fígado com perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presenças de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação do sinusóide hepático (Figura 13A). Os cortes histológicos dos tecidos esplênicos demonstraram formações de centros de melanomacrófagos, bem como a presença de melanomacrófagos livres e dispersos (Figura 13B). Ainda, a análise histopatológica de tecidos renais revelou a presença de túbulos necróticos, núcleos picnóticos, redução lúmen tubular, presença de infiltrado inflamatório e retração glomerular (Figura 13C). As lesões apresentadas nestes órgãos foram observadas em maior frequência e com intensidade mais severas em animais controles, quando comparados aos animais tratados com doxiciclina.

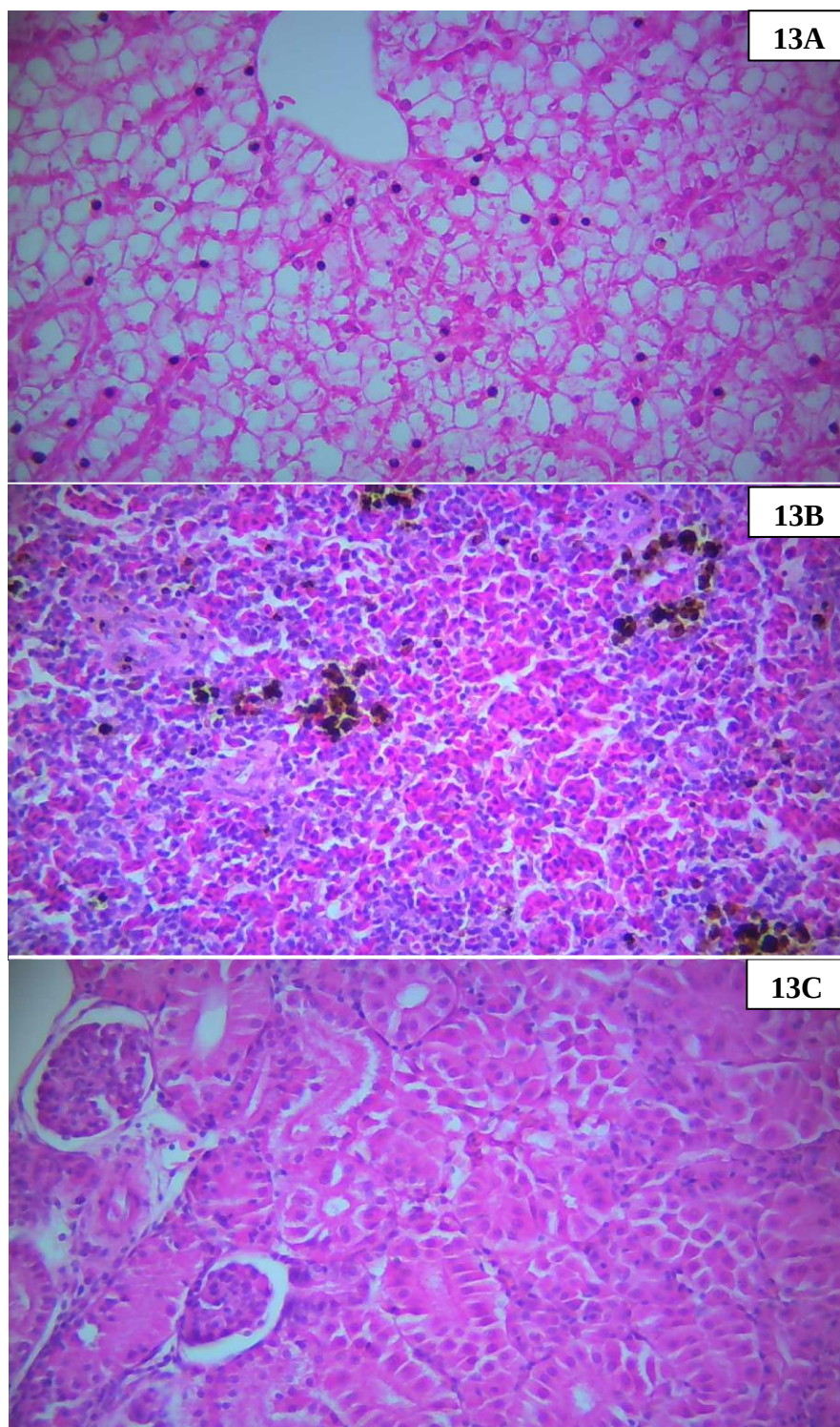


Figura 13. Fotomicrografias de cortes histológicos de tilápias com infecção por *Aeromonas hydrophila*. 13A. Fígado com perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presenças de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação sinusóide hepática. 13B. Baço com presença de formação de centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres. 13C. Rim apresentando túbulos necróticos, núcleos picnóticos, redução lúmen tubular, infiltrado inflamatório, retração glomerular. Coloração de H.E, aumento de 40x.

3.2. *Streptococcus agalactiae*

3.2.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC)

A determinação do teste de concentração mínima inibitória da doxiciclina para *S. agalactiae* revelou 2 µg/mL como a quantidade mínima desta tetraciclina para inibir o crescimento deste microrganismo.

3.2.2. Teste de sensibilidade à doxiciclina

A interpretação do tamanho do halo formado para *S. agalactiae* em disco com 30µg de Doxiciclina de acordo com CLSI: Resistente: ≤ 18 ; Indeterminado: 19-22 e Sensível: ≥ 23 . Resultado obtido foi de 23mm, sendo classificado como sensível a Doxiciclina.

3.2.3. Avaliação clínica e comportamental

Peixes doentes (não tratados com doxiciclina) e tratados com a menor dose (20mg), exibiram sinais típicos de estreptococose após 120 e 144 horas respectivamente, incluindo letargia, natação errática, rigidez dorsal, exoftalmia e opacidade da córnea. Foram observados também alguns sinais clínicos nos animais tratados com 40mg de doxiciclina como leve exoftalmia, opacidade córnea e erosão nas nadadeiras, porém nenhum sinal clínico e comportamental foi observado nos animais tratados com 80mg de doxiciclina.

3.2.4. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier

As tilápias tratadas com 80 mg de doxiciclina e desafiadas com *S. agalactiae* apresentaram mortalidade significativamente menor ($P < 0.05$) comparado aos tratamentos 20, 40 mg e controle (Figura 14). A razão de risco de morte dos peixes não tratados (controle) é 4,60 (1,86; 11,37) maior comparado aos peixes que receberam 80 mg de doxiciclina. Ainda os animais tratados com 20 mg e 40 mg apresentam 3,40 (1,27; 9,08) e 2,72 (0,95; 7,76) risco de morte, respectivamente, em comparação ao tratamento com 80 mg de doxiciclina.

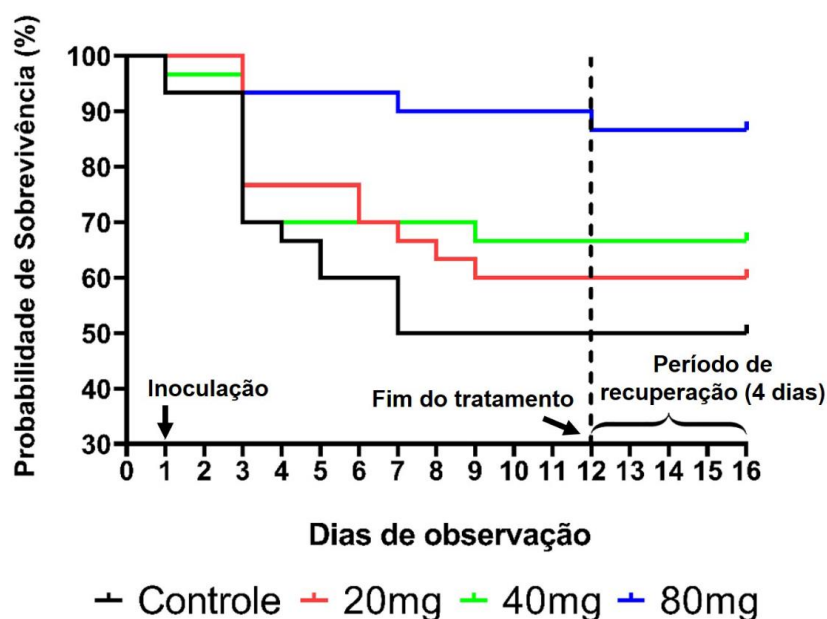


Figura 14. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para *Streptococcus agalactiae*.

A Tabela 5 apresenta o percentual relativo de sobrevivência (RPS) das tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com doxiciclina. Verificou-se efeito dose-resposta ao tratamento com esta tetraciclina com RPS de 20, 33,3 e 73,3% dos tratamentos com 20, 40 e 80 mg/kg de p.v. quando comparado aos animais controles.

Tabela 5. Percentual relativo de sobrevivência das tilápias infectadas com *S. agalactiae* e tratadas com diferentes doses de doxiciclina.

Tratamento	Número de animais mortos	Mortalidade (%)	Percentual relativo de sobrevivência (RPS) ¹
Controle	15 (30)	50	.
20 mg de doxiciclina	12 (30)	40	20
40 mg de doxiciclina	10 (30)	33,3	33,3
80 mg de doxiciclina	4 (30)	13,3	73,3

¹ Porcentagem relativa de sobrevivência (RPS), calculada pela equação: $RPS = [1 - (\% \text{ mortalidade do grupo tratado} / \% \text{ mortalidade do grupo controle})] \times 100$

3.2.5. Análise hematológica

Na avaliação hematológica de tilápias tratadas com doxiciclina não foi observado diferença significativa ($P < 0.05$) nos valores circulantes de eritrócitos, VCM e HCM. Entretanto, 11 dias após estímulo bacteriano, os animais tratados com 80mg de doxiciclina tiveram aumento de CHCM e hemoglobina em comparação ao grupo controle (Figura 15).

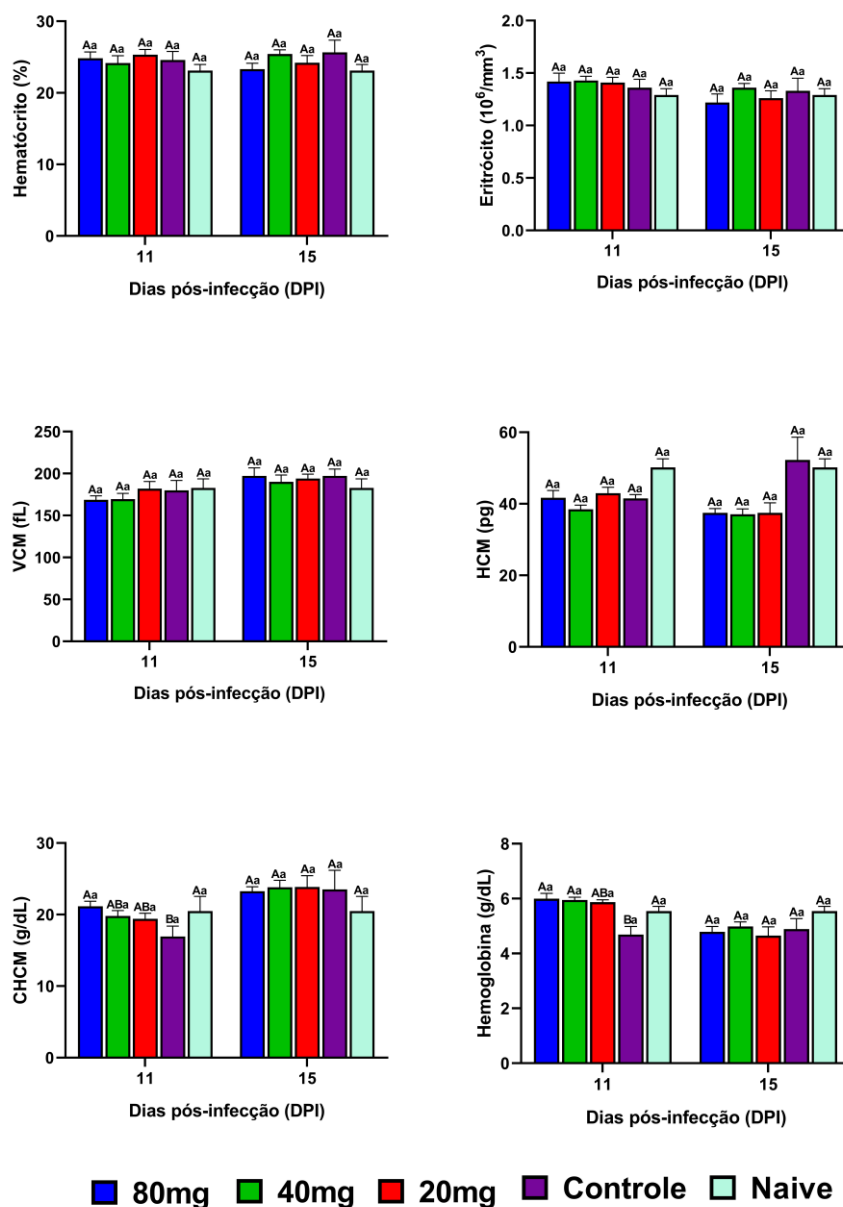


Figura 15. Análise sanguínea de tilápias após tratamento com Doxiciclina e desafiadas com *S. agalactiae*. Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

Os resultados observados no leucograma das tilápias tratadas com doxiciclina mostraram que a dose mais alta do antimicrobiano (80mg) levou a uma leucocitose devido a neutrofilia, linfocitose e trombocitose em comparação aos animais do grupo controle em 11 dias após estímulo bacteriano. Embora não foi observado diferença estatística significativa ($P < 0.05$) na contagem de monócitos, pode-se observar que a contagem diferencial nos animais tratados com doxiciclina foram superiores ao grupo controle (Figura 16).

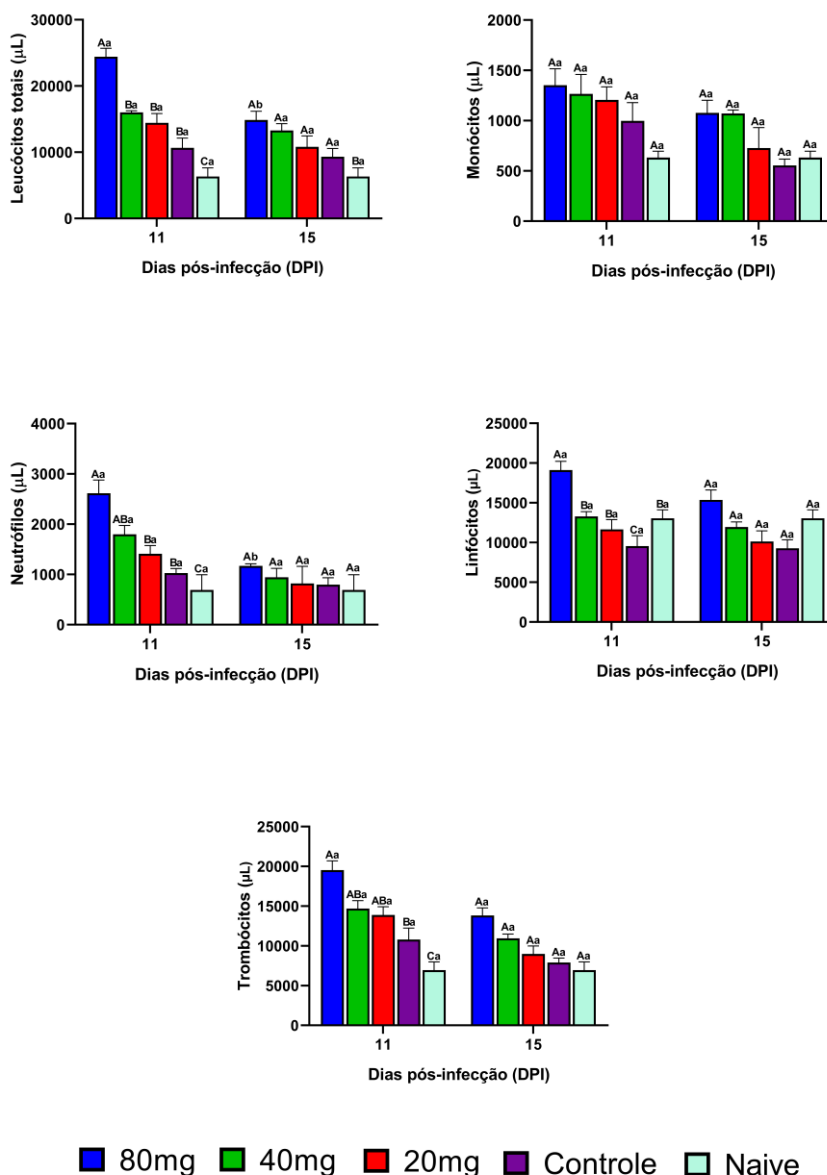


Figura 16. Análise leucocitária de tilápias após tratamento com Doxiciclina e desafiadas com *S. agalactiae*. Médias ($n=7$) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.2.6. Burst respiratório leucocitário

As análises de produção de reativos de oxigênio (ROS) apresentou diminuição nos tratados com 80 e 40mg de doxiciclina, chegando próximo aos valores observado no padrão fisiológico, em relação aos tratados com a menor dose (20mg) e ao grupo controle (Figura 17).

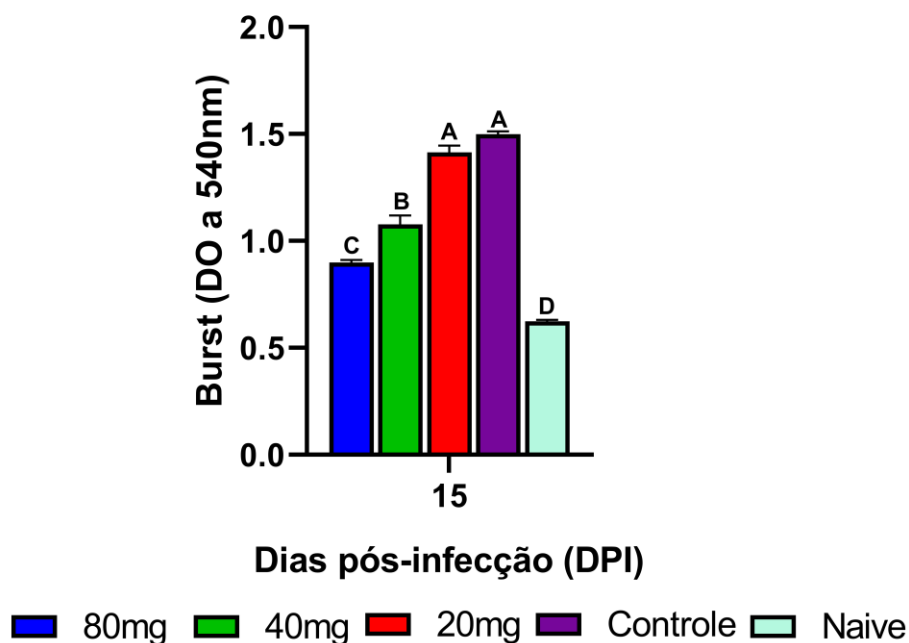


Figura 17. Valores médios observados na determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) para tilápias inoculadas *Streptococcus agalactiae* e tratadas com diferentes doses de doxiciclina 15 dias após a inoculação (período de recuperação). Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos.

3.2.7. Mensuração de anticorpos por métodos Elisa indireto

Na mensuração de anticorpos por método indireto de Elisa, demonstrou efeito dose-resposta em relação ao uso doxiciclina, sendo observado maiores concentrações nos animais tratados com 80mg em ambos os períodos experimentais (11 e 15 DPI), quando comparados aos animais controles, além de peixes tratados com 20 mg (15 DPI) (Figura 18).

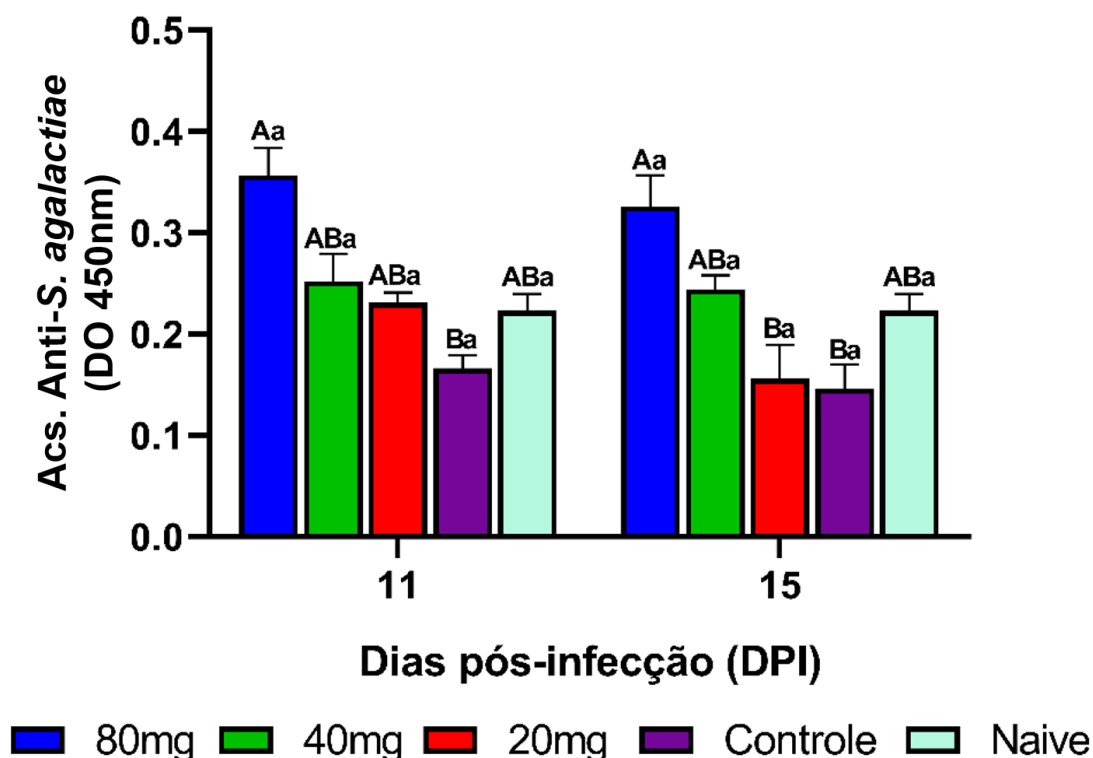


Figura 18. Valores médios da densidade ótica determinada por ELISA indireto da quantidade de anticorpos anti-*Streptococcus agalactiae* em tilápias inoculadas com *S. agalactiae* e tratadas com doxiciclina. Médias (n=7) seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Letras maiúsculas comparam os diferentes tratamentos dentro de cada dia experimental, letras minúsculas comparam a evolução de cada tratamento entre os diferentes dias experimentais.

3.2.8. Alterações histopatológicas

O estudo histopatológico de tilápias inoculadas com *A. hydrophila* apresentou alterações no fígado com perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presenças de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação sinusóide hepática (Figura 19A). Os cortes histológicos dos tecidos esplênicos demonstraram formações de centros de melanomacrófagos, bem com a presença de melanomacrófagos livres e dispersos (Figura 19B). A análise histopatológica de tecidos renais revelou glomerulonefrite membranosa com necrose tubular, isquemia glomerular, túbulos necróticos, redução lúmen tubular, espessamento hialino do mesângio e infiltrado inflamatório (Figura 19C). As lesões apresentadas nestes órgãos foram observadas em maior frequência e com graus mais severos em animais controles quando comparados aos animais tratados com doxiciclina.

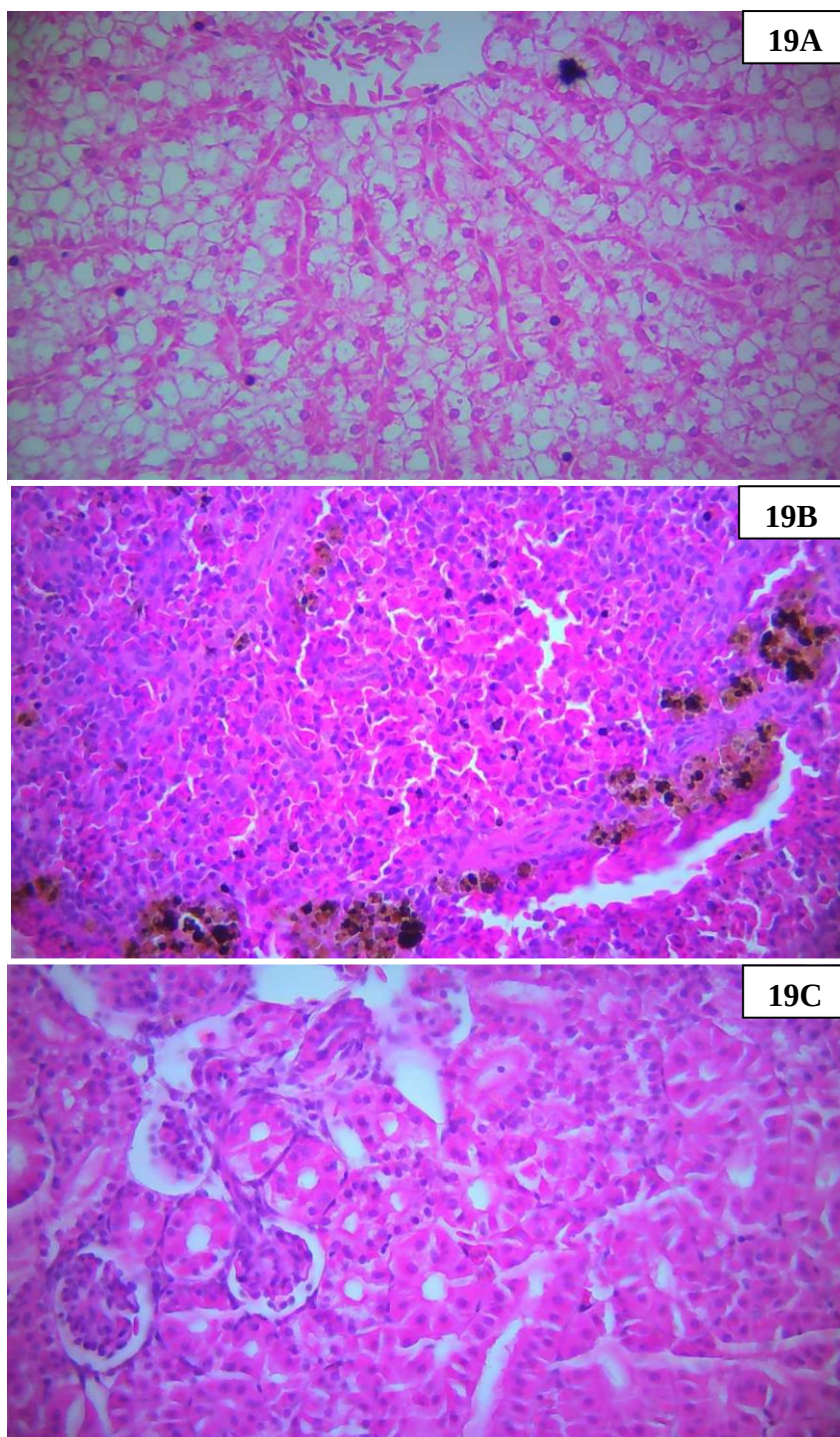


Figura 19. Fotomicrografias de cortes histológicos de tilápias com infecção por *Streptococcus agalactiae*. 19A. Fígado com perda da arquitetura dos cordões hepáticos, presenças de núcleos picnóticos, degeneração hidrópica com necrose de hepatócitos e dilatação sinusóide hepática. 19B. Baço com presença de formação de centros de melanomacrófagos e melanomacrófagos livres. 19C. Rim apresentando glomerulonefrite membranosa com necrose tubular, isquemia glomerular, túbulos necróticos, redução lúmen tubular, espessamento hialino do mesângio e infiltrado inflamatório. Coloração H.E, aumento de 40x.

4. DISCUSSÃO

4.1. *Aeromonas hydrophila*

O estudo de eficácia terapêutica da doxiciclina em tilápias revelou efeito dose-resposta no controle antimicrobiano de *Aeromonas hydrophila* durante infecção experimental, resultando em eficácia de 60, 73,3 e 93,3% para os tratamentos com 20, 40 e 80 mg de doxiciclina/Kg de p.v. quando comparado aos peixes do grupo controle, corroborando os achados dos estudos de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma) realizado com discos contendo 30 µg de doxiciclina e da concentração inibitória mínima de 5 µg/mL. Yang et al. (2014) avaliaram a farmacocinética de 20mg de doxiciclina/kg de p.v. em tilápia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*) após administração oral, sendo observado o fenômeno de pico duplo: o primeiro de $1,99 \pm 0,43$ µg/mL em 2,0 horas e o segundo de $2,27 \pm 0,38$ µg/mL em 24,0 horas, sugerindo a hipótese de que as doses maiores empregadas neste estudo, principalmente de 80mg, tenham alcançado concentrações superiores a 5 µg de doxiciclina/mL (observadas no estudo *in vitro*), capazes de controlar efetivamente a cepa de *Aeromonas hydrophila* usada neste ensaio experimental, justificando a significativa eficácia e o efeito dose-resposta.

As avaliações dos parâmetros hematológicos são importantes e usadas rotineiramente na aquicultura, pois fornecem indicações do estado da saúde dos peixes e auxiliam a descrever anormalidades causadas por condições estressantes e patológicas (Costa et al. 2022). As tilápias tratadas com doxiciclina e grupo controle apresentaram aumento na contagem de eritrócitos e hematócrito, como observado por Ambili et al. (2013) em carpa major indiana (*Labeo rohita*) tratada com oxitetraciclina. A hemoconcentração pode estar relacionada a alterações no equilíbrio hidroeletrolítico, pois em condições estressantes ocorre a liberação de cortisol endógeno e aumento de esteróides com funções glico e mineralocorticóide, resultando em desequilíbrio eletrolítico e alterações no volume de água presente no líquido extracelular sanguíneo (Belo et al., 2014).

A microcitose observada nos animais tratados com doxiciclina possivelmente ocorreu em virtude aos efeitos deletérios do estresse, pois o cortisol possui amplo espectro de atividade em peixes (Weendelar-Bonga, 1997), regulando o equilíbrio hidromineral e o metabolismo energético. Além disto, casos de microcitose podem ocorrer no curso de processos inflamatórios (Van Vranken, 2010). Alterações similares podem ser observadas associadas a anemia em processos inflamatórios induzidos por inoculação de bactérias em tilápias do Nilo

(Ranzani-Paiva et al., 2004; Alsaïd et al., 2014). Estudo recente, evidenciou efeito colateral do tratamento com 500 µg de zafirlucaste em peixes durante aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila*, caracterizado por microcitose (Aracati et al., 2021), corroborando com os achados do presente estudo.

Os efeitos imunomoduladores dos fármacos antibacterianos são numerosos e variáveis dependendo do fármaco utilizado (Saglam e Yonar, 2009). A leucocitose nos animais tratados com doxiciclina pode ser devido à estimulação da linfocitose nos tecidos linfomielóides e sua posterior liberação (Oluah et al., 2020). Como um componente essencial do sistema imunológico em animais, o aumento significativo na contagem de leucócitos neste estudo pode ser considerado uma resposta imune adaptativa protetora à exposição bacteriana, para aumentar a produção de anticorpos para garantir a sobrevivência dos peixes, evidenciando os resultados obtidos na mensuração de anticorpos por técnicas de Elisa, ficando claro o aumento de imunoglobulinas IgM em tilápias submetidas ao tratamento com 80 mg de doxiciclina, possivelmente pelo efeito imunomodulador do fármaco. Os anticorpos IgM constituem o principal componente dos anticorpos naturais e também são a primeira classe de anticorpos produzidos durante uma resposta primária de anticorpos, justificando esse aumento observado no presente estudo (Magnadóttir, 2006). Tal achado também foi observado por Hang et al. (2014), que avaliou o tratamento com Levamisol e Doxiciclina em bagres listrados (*P. hypophthalmus*) desafiados com *E. ictaluri*, mostrando um aumento de imunoglobulinas totais nos peixes tratados, sugerindo serem bons candidatos para aumentar a resposta imune e proteção contra *E. ictaluri*.

As análises de produção de reativos de oxigênio (ROS) apresentou aumento significativo em animais controles. O incremento de ROS pode estar associado ao aumento da atividade respiratória de leucócitos, denominada de Burst oxidativo. Farias et al. (2016), demonstrou correlação positiva associada ao aumento de neutrófilos e monócitos ao aumento da produção de ROS em pacus durante reação inflamatória por processo infeccioso. Os achados da avaliação do “burst” respiratório de leucócitos das tilápias demonstram o efeito antimicrobiano da doxiciclina.

4.2. *Streptococcus agalactiae*

O estudo de eficácia terapêutica da doxiciclina em tilápias revelou efeito dose-resposta no controle antimicrobiano de *Streptococcus agalactiae* durante infecção experimental,

resultando em eficácia de 20, 33,3 e 73,3% para os tratamentos com 20, 40 e 80 mg de doxiciclina/Kg de p.v. quando comparado aos peixes controles, corroborando os achados dos estudos de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma) realizado com discos contendo 30 µg de doxiciclina e da concentração inibitória mínima de 2 µg/mL. Na comparação da eficácia deste antimicrobiano contra *Aeromonas hydrophila* tinha se verificado um halo de sensibilidade no antibiograma maior, fato que resultou em maior eficácia do tratamento quando comparado ao tratamento da infecção por *Streptococcus agalactiae*, apesar deste coccus apresentar a necessidade concentrações menores para inibir seu crescimento *in vitro*. Tal fato pode ser explicado pela fisiopatologia de ambas as bacterioses, pois na estreptococose verificou-se um curso mais agudo da doença com mortalidades mais precoces, quando comparada a aeromonose, justificando a diferença da eficácia da doxiciclina. Xu et al. (2019) verificaram que o aumento da temperatura da água diminuiu a meia-vida dos tecidos, mas aumentou o pico plasmático de doxiciclina em carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) após administração oral. Enquanto, a farmacocinética da dose de 20mg de doxiciclina/kg de p.v. em tilápia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*) após administração oral, apresentou dois picos plasmáticos: o primeiro de $1,99 \pm 0,43$ µg/mL em 2,0 horas e o segundo de $2,27 \pm 0,38$ µg/mL em 24,0 horas (Yang et al., 2014), sugerindo a hipótese de que as doses maiores empregadas neste estudo, principalmente de 80mg, tenham alcançado concentrações superiores a 2 µg de doxiciclina/mL (observadas no estudo *in vitro*), capazes de controlar efetivamente a cepa de *Streptococcus agalactiae* usada neste ensaio experimental, justificando a sua eficácia e o efeito dose-resposta.

As variáveis hematológicas são úteis no diagnóstico clínico e são frequentemente utilizadas para detectar alterações fisiológicas após diferentes condições de estresse. Assim, a hematologia pode ser um índice essencial para o estado geral de saúde em várias espécies de peixes (Wedemeyer e Yasutake, 1977).

Rijkers et al. (1981) afirmaram que a administração oral de antibacterianos pode diminuir significativamente as hemácias, resultando em anemia. Por outro lado, no presente estudo, o tratamento com doxiciclina para a tilápia do Nilo não interferiu nas contagens de eritrócitos, assim como observado por Sampaio et al. (2016), que estudou a sulfametazina em tilápias.

A redução nos teores de hemoglobina nos animais do grupo controle possivelmente indica que as bactérias estão usando o ferro presente na hemoglobina dos eritrócitos. As bactérias causam hemólise eritrocitária, que libera mais hemoglobina e grupos heme para a corrente

sanguínea (Carraschi et al., 2017). Essa capacidade está relacionada a um fator de virulência bacteriana e envolve sideróforos, que são cofatores de transporte de ferro secretados por bactérias (Massad et al., 1991). Uma baixa concentração de ferro é a principal mudança que ocorre quando as bactérias invadem um hospedeiro e produzem fatores de virulência (Sousa et al., 2021).

A utilização de imunostimulantes na aquicultura para controle de doenças em peixes é fundamental, pois facilita, por exemplo, a função das células fagocitárias e aumenta suas atividades bactericidas (Dobšíková et al., 2013). A doxiciclina é amplamente relatada por possuir atividade imunomoduladora através da inibição de várias vias inflamatórias, reforçando ao observado por Patel et al. (2020), que avaliou o efeito imunostimulador da doxiciclina durante a inflamação sistêmica e pulmonar causada por sepse em roedores.

As tilápias tratadas com doxiciclina apresentaram leucocitose, em especial, a dose de 80 mg, influenciada por neutrofilia, linfocitose e trombocitose, tal como, observado por Carraschi et al. (2017), que avaliaram a resposta hematológica em *Piaractus mesopotamicus* após tratamento com enrofloxacina e toltrazuril ou com florfenicol e tiametoxam. Os leucócitos estão envolvidos na regulação da função imunológica e na resposta protetora ao estresse em peixes, em que a diminuição na contagem de leucócitos pode ser detectada, por exemplo, pela alteração da linfopoiese ou pela liberação alterada de linfócitos dos tecidos linfóides, enquanto um aumento pode resultar da resposta imune a bactérias (Carraschi et al., 2017). Estes achados estão relacionados com a mensuração de anticorpos por método de ELISA, em que as tilápias tratadas com doxiciclina mostraram aumento de imunoglobulinas, mas apenas o tratamento com 80 mg de doxiciclina induziu diferenças significativas com o controle, ocorrendo possivelmente pelo efeito imunomodulador do fármaco. Esse aumento de imunoglobulina também foi descrito por Hang et al. (2014) ao utilizar imunostimulante em bagres listrados (*Pangasianodon hypophthalmus*) contra a infecção bacteriana por *Edwardsiella ictaluri*. Caipang et al. (2009) afirmaram que a resposta imune dos peixes aos antimicrobianos dependem da droga, do procedimento adotado e da espécie do peixe.

As tetraciclina são amplamente utilizadas nas pisciculturas e conhecidas por terem atividades imunomoduladoras (Hang et al., 2014). Woo et al. (1999) observaram que ampicilina, claritromicina e doxiciclina aumentam a resposta de anticorpos induzida por *Salmonella typhi* atenuada viva (Ty21a), sugerindo efeito imunogênico do antimicrobiano, consolidando com os achados do presente estudo.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são consideradas subprodutos de processos oxidativos celulares normais. Além disso, os níveis de ROS podem aumentar drasticamente no estresse ambiental ou presença de patógenos (Kubatka et al., 2015). Isto justifica o ocorrido no presente estudo, pois a produção de ROS aumentou significativamente em animais controles após estímulo com *Streptococcus agalactiae*, quando comparado aos animais tratados com doxiciclina, principalmente na dose mais alta (80 mg). Charlie-Silva et al., (2019) observou durante a reação inflamatória por *A. hydrophila* aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio em comparação ao grupo controle. Estudos realizados por Sibi (2015), mostraram que extratos de *Chlorella* apresentam atividade inibitória de ROS, reduzindo significativamente a produção do mesmo e consequentemente amenizando os danos celulares durante a inflamação.

Nosso estudo forneceu resultados convincentes da eficácia terapêutica da doxiciclina em tilápias do Nilo frente a duas importantes bacterioses (*S. agalactiae* e *A. hydrophila*), revelando efeito dose-resposta para o controle das infecções experimentais, bem como na produção de anticorpos anti-*S. agalactiae* e anti-*A. hydrophila*, confirmando a hipótese de que a ação antimicrobiana da doxiciclina, principalmente na dose de 80mg/kg, auxiliou os mecanismos de defesa das tilápias, exercendo efeitos positivos sobre as respostas imunes humorais desses animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALSAID, M.; ABUSELIANA, A. F.; DAUD, H. H.; MUSTAPHA, N. M.; BEJO, S. K.; ABDELHADI, Y. M.; HAMDAN, R. H. Haematological, biochemical and clinical signs changes following experimental infection of *Streptococcus agalactiae* in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). **Aquac. Indones.** v. 15, p. 289-295, 2014.
- AMBILI, T. R.; SARAVANAN, M.; RAMESH, M.; ABHIJITH, D. B.; POOPAL, R. K. Toxicological effects of the antibiotic oxytetracycline to an Indian major carp *Labeo rohita*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology.** v. 64, n. 3, p. 494-503, 2013.
- ANVISA – **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**, Diretriz Aprovada — Sexta Edição. CLSI, v. 23, n. 2, 2014.

- ARACATI, M., RODRIGUES, L., OLIVEIRA, S., MORAES, A., PRADO, E., FERNANDES, D., ... BELO, M. Clinical safety of Zafirlukast treatment during acute inflammatory reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**, v. 37, n. 2, p. 67-73, 2021.
- ASSANE, I. M.; GOZI, K. S.; VALLADÃO, G. M. R.; PILARSKI, F. Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: Emphasis on the use of thiamphenicol/florfenicol against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**. v. 507, p. 238-245, 2019.
- BELO, M. A. A.; MORAES, F. R.; YOSHIDA, L.; ROSA PRADO, E. J.; 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, p. 124-128, 2014.
- BELO, M.A.A. et al. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of Fish Biology**, v. 82, n. 4, p. 1403-1410, 2013.
- BOYD, CLAUDE E. Water Quality in Ponds for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment 416 Station, Auburn University, AL, USA, 1990.
- CAIPANG, C. M. A.; BERG, I.; BRINCHMANN, M. F.; KIRON, V. Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. **Aquaculture**. v. 295, n. 1-2, p. 110-115, 2009.
- CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. **Aquaculture Research**. v.32, p. 297-304, 2001.
- CARRASCHI, S. P.; FLORÊNCIO, T.; IGNÁCIO, N. F.; IKEFUTI, C. V.; CRUZ, C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematological and histopathological assessment of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after treatment of pathogens with veterinary medicinal products. **Comparative Clinical Pathology**. v. 26, n. 1, p. 105-114, 2017.
- CHARLIE-SILVA, Ives et al. Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: fish-model. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- CLISSA, P. B.; OREFICE, D. P.; COLOMBINI, M.; GUIMARÃES, M. C.; BACH, E. E.; DIAS, D. C.; TACHIBANA, L. Production of polyclonal antibodies anti-IgM of nile tilapia, *Oreochromis niloticus* for standardization of immunoenzymatic assay. **Ars Veterinaria**. v. 37, n. 1, p. 03-04, 2021.

- CLSI – Manual de Antibiograma, LaborClin, 2019. Disponível em: laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual_antibiograma_2019.pdf
- COSTA, C.; OLIVEIRA, S.; ARACATI, M.; RODRIGUES, L.; COLTURATO, L.; MONTASSIER, H.; BELO, M. Clinical safety of treatment with zileuton, 5-lox inhibitor, during acute inflammatory reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**. v. 38, n. 1, p. 23-30, 2022.
- CROSS, R.; LING, C.; DAY, N. P.; MCGREADY, R.; PARIS, D. H. Revisiting doxycycline in pregnancy and early childhood—time to rebuild its reputation. **Expert opinion on drug safety**. v. 15 n. 3, p. 367-382, 2016.
- DOBŠÍKOVÁ, R.; BLAHOVÁ, J.; MIKULÍKOVÁ, I.; MODRÁ, H.; PRÁŠKOVÁ, E.; SVOBODOVÁ, Z.; ... SIWICKI, A. K. The effect of oyster mushroom β -1.3/1.6-D-glucan and oxytetracycline antibiotic on biometrical, haematological, biochemical, and immunological indices, and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & shellfish immunology**. v. 35, n. 6, p. 1813-1823, 2013.
- FARIAS, T. H. V.; LEVY-PEREIRA, N.; DE OLIVEIRA ALVES, L.; DE CARLA DIAS, D.; TACHIBANA, L.; PILARSKI, F. & RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**. v. 211, p. 137-144, 2016.
- FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Approved aquaculture drugs. New Hampshire: U.S. Food and Drug Administration, 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs>
- GASTALHO, S.; SILVA, G.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**. v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.
- HANG, B. T. B.; PHUONG, N. T.; KESTEMONT, P. Can immunostimulants efficiently replace antibiotic in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) against bacterial infection by *Edwardsiella ictaluri*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 40, n. 2, p. 556-562, 2014.
- KUBATKA, P.; KAPINOVÁ, A.; KRUŽLIAK, P.; KELLO, M.; VÝBOHOVÁ, D.; KAJO, K.; ... ; DOBROTA, D. Antineoplastic effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the breast cancer model. **Nutrition**. v. 31, n. 4, p. 560-569, 2015.

- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & shellfish immunology**. v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.
- MASSAD, G.; ARCENEUX, J. E.; BYERS, B. R. Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species. **Microbiology**. v. 137, n. 2, p. 237-241, 1991.
- NAFIQOH, N.; NOVITA, H.; SUGIANI, D.; GARDENIA, L.; TAUKHID, T.; WIDYANINGRUM, A.; SUSANTI, D. R. *Aeromonas hydrophila* AHL 0905-2 and *Streptococcus agalactiae* N14G as Combined Vaccine Candidates for Nile Tilapia. **HAYATI Journal of Biosciences**. v. 29, n. 2, p. 137-145, 2022.
- NAKAMURA, Y. Doxycycline. **Fish Pathology**. v. 17, p. 67-76, 1982.
- 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.
- NIWETPATHOMWAT, A. A retrospective study of the therapeutic efficacy of doxycycline on concurrent canine ehrlichiosis and babesiosis in a veterinary hospital population. **Comparative Clinical Pathology**. v. 15, n. 4, p. 215-219, 2006.
- NOCHOT, H.; LOIMEK, S.; PRIYAVORAVONG, P.; WONGKAMCHAI, S.; SARASOMBATH, P. T. Therapeutic efficacy of doxycycline in domestic cats naturally infected with *Brugia malayi* in field condition. **Experimental parasitology**. v. 200, p. 73-78, 2019.
- OLIVEIRA, S. L.; ARACATI, M. F.; RODRIGUES, L. F.; COSTA, C. C.; CONDE, G.; MORAES, A. C.; MANRIQUE, W. G.; CHARLIE-SILVA, I.; BELO, M. A. A. Clinical safety of zafirlukast treatment during a foreign body inflammatory reaction in Nile tilapias, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Development Research**. v.11, p. 47914-47919, 2021.
- OLUAH, N. S.; AGUZIE, I. O.; EKECHUKWU, N. E.; MADU, J. C.; NGENE, C. I.; OLUAH, C. Hematological and immunological responses in the African catfish *Clarias f airepinus* exposed to sublethal concentrations of herbicide Ronstar®. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 201, p. 110824, 2020.
- PATEL, A.; KHANDE, H.; PERIASAMY, H.; MOKALE, S. Immunomodulatory effect of doxycycline ameliorates systemic and pulmonary inflammation in a murine polymicrobial sepsis model. **Inflammation**. v. 43, n. 3, p. 1035-1043, 2020.
- RAJENDRAN, V.; SINGH, C.; GHOSH, P. C. Improved efficacy of doxycycline in liposomes against *Plasmodium falciparum* in culture and *Plasmodium berghei* infection in

- mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 96, n. 11, p. 1145-1152, 2018.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; EIRAS, A. C. D.; SILVEIRA, V. R. D. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 47, n. 6, p. 945-953, 2004.
- RIGOS, G.; SMITH, P. A critical approach on pharmacokinetics, pharmacodynamics, dose optimisation and withdrawal times of oxytetracycline in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**. v. 7n. 2, p. 77-106, 2015.
- RIJKERS, G. T.; VAN OOSTEROM, R.; VAN MUISWINKEL, W. B. The immune system of cyprinid fish. Oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). **Veterinary immunology and immunopathology**. v. 2, n. 3, p. 281-290, 1981.
- SAGLAM, N.; YONAR, M. E. Effects of sulfamerazine on selected haematological and immunological parameters in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). **Aquaculture Research**. v. 40, n. 4, p. 395-404, 2009.
- SAMPAIO, F. G., CARRA, M. L., JONSSON, C. M., GONÇALVES, V. T., DAL'BO, G., NUNES, K. S. D., ... REYES, F. G. R. Effects of dietary exposure to sulfamethazine on the hematological parameters and hepatic oxidative stress biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 97(4), 528-535, 2016.
- SARTINI, I.; ŁEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA, B.; LISOWSKI, A.; POAPOLATHEP, A.; SITOVS, A.; GIORGI, M. Doxycycline pharmacokinetics in geese. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 44, n. 6, p. 975-981, 2021.
- SAS Institute Inc. **SAS/STAT software changes and enhancements through computer program**. Release 8.9.3. Cary: SAS Institute, 2012.
- SIBI, G. Inhibition of lipase and inflammatory mediators by *Chlorella* lipid extracts for antiacne treatment. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**. v. 6, n. 1, p. 7, 2015.
- SMITH, P. Antibiotics in aquaculture: reducing their use and maintaining their efficacy. In: **Infectious Disease in Aquaculture**. Woodhead Publishing, p. 161-189, 2012.

- SOLIMAN, A. M.; ABOUBAKR, M.; EL-HEWAITY, M. Bioequivalence study of two oral doxycycline formulations (Doxysol® and Doxymed®) in healthy broiler chickens. **Pharmacology & Pharmacy**. v. 6, n. 01, p. 1, 2015.
- SOUSA, E. L.; ASSANE, I. M.; SANTOS-FILHO, N. A.; CILLI, E. M.; DE JESUS, R. B.; PILARSKI, F. Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after treatment using antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**. v. 533, p. 736181, 2021.
- VAN VRANKEN, M. Evaluation of microcytosis. *American family physician*, v.82, n.9, p. 1117-1122, 2010.
- WEDEMEYER, G. A.; YASUTAKE, W. T. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health (Vol. 89). **Department of the Interior, Fish and Wildlife Service**, 1977.
- WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v.22, n.5, 1970.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological reviews**. v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.
- WOO, P. C.; TSOI, H. W.; WONG, L. P.; LEUNG, H. C.; YUEN, K. Y. Antibiotics modulate vaccine-induced humoral immune response. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 6, n. 6, p. 832-837, 1999.
- XU, N.; LI, M.; FU, Y. U.; ZHANG, X.; DONG, J.; LIU, Y.; ... LIN, Z. Effect of temperature on plasma and tissue kinetics of doxycycline in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after oral administration. **Aquaculture**. v. 511, p. 734204, 2019.
- YANG, F.; LI, Z. L.; SHAN, Q.; ZENG, Z. L. Pharmacokinetics of doxycycline in tilapia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*) after intravenous and oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 37, n. 4, p. 388-393, 2014.
- ZOZAYA, H.; GUTIERREZ, L.; BERNAD, M. J.; SUMANO, H. Pharmacokinetics of a peroral single dose of two long-acting formulations and an aqueous formulation of doxycycline hyclate in horses. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 55, n. 1, p. 1-7, 2013.

CAPÍTULO 4 – Avaliação ecotoxicológica da Doxiciclina em organismos de diferentes níveis tróficos das cadeias biológicas aquáticas

Susana Luperini de Oliveira¹, Camila Carlino da Costa¹, Mayumi Fernanda Aracati¹, Leticia Franchin Rodrigues¹, Gabriel Conde¹, Romário Alves Rodrigues², Claudinei da Cruz³, Hélio José Montassier⁴

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

² Departamento de Microbiologia de alimentos, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

³ Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia do Agrotóxicos, UNIFEB, Barretos/SP.

⁴ Departamento de Patologia animal, UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP.

Resumo - O presente estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda da Doxiciclina para organismos de diferentes níveis tróficos das cadeias biológicas aquáticas. Para tal, foram delineados seis ensaios ecotoxicológicos e determinação de CL₅₀ em peixes (*Hyphessonobrycon eques*), plantas aquáticas (*Lemna minor*, *Azolla carolinia* e *Wolffia brasiliensis*), crustáceos (*Macrobrachium acanthurus*) e moluscos (*Pomacea canaliculata*). Os resultados do estudo ecotoxicológico da Doxiciclina para diferentes organismos aquáticos mostraram que o antimicrobiano foi classificado como moderadamente tóxico para o organismo teste *W. brasiliensis* e praticamente não tóxico para os demais organismos testes, demonstrando que a doxiciclina em tilápias em seu conjunto possui potencial para uso na tilapicultura, apresentando boa margem de segurança ambiental.

Palavras-chave: crustáceos, moluscos, peixes, plantas aquáticas, segurança ambiental, tetraciclina.

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antimicrobianos na aquicultura acelerou significativamente o desenvolvimento de resistência a antibióticos e o acúmulo de resíduos de antimicrobianos no ambiente aquático, se tornando necessário o desenvolvimento de tratamentos ecologicamente corretos e eficazes de doenças bacterianas em peixes cultivados (Assane et al., 2021).

O termo ecotoxicologia foi introduzido por Truhalt (1969), devido à preocupação sobre o efeito de compostos químicos ambientais sobre as espécies. Os primeiros testes de toxicidade com organismos aquáticos foram na década de 1930 (Silva et al, 2015), o estudo da ecotoxicologia aquática foi criado para ajudar nos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos (Magalhães & Filho, 2008).

Nos últimos anos vem sendo utilizados no Brasil, testes ecotoxicológicos para o monitoramento e avaliação da água (Magalhães & Filho, 2008). A ecotoxicologia estuda os efeitos de agentes químicos (Silva et al, 2015) e físicos sobre os organismos vivos, populações e comunidades em seu ecossistema (Zagatto, 2008). Sendo importante para auxiliar nas análises de impactos ambientais causados por esses agentes, avaliando assim sua toxicidade em relação ao organismo teste utilizado (Silva et al, 2015).

A ecotoxicologia terrestre possui um papel menor na avaliação de “efeitos colaterais” farmacêuticos comparado com a toxicologia aquática, isso se deve ao fato de que os medicamentos humanos geralmente não atingem o ambiente terrestre, já nos medicamentos veterinários a situação é diferente, pois são depositados principalmente no ambiente terrestre (Schmitt & Römbke, 2008). Medicamentos veterinários como antibióticos ou anti-helmínticos são aplicados regularmente aos animais de produção, os resíduos podem alcançar, diretamente, os solos das pastagens através das fezes do gado, e, indiretamente, atingem solos agrícolas por meio do esterco coletado em estábulos (Schmitt & Römbke, 2008). O esterco é muito utilizado como fertilizante nas produções agrícolas, implicando na liberação de resíduos de drogas e seus metabólitos no meio ambiente, sendo um fator preocupante pelos possíveis efeitos ambientais que causam (Fernandez et al., 2004).

A doxiciclina é um isômero estrutural da tetraciclina com atividade antimicrobiana de amplo espectro, muito utilizada para tratar doenças infecciosas em animais de produção (Fernandez et al., 2004). Em relação a toxicocinética disponível, apresenta baixo potencial de metabolismo, e após administração intravenosa ou oral, o fármaco praticamente não se altera (90-95%), sendo excretado pela urina e fezes. Portanto, os excrementos do gado terão quase

toda a dose administrada, e conseqüentemente serão liberados ao ambiente (Fernandez et al., 2004).

Devido a drenagem e escoamento gerados nas práticas agrícolas, ocorre a exposição direta aos organismos terrestres e indireta de organismos aquáticos. De acordo com Schmitt & Römcke (2008), os medicamentos veterinários muitas vezes agem de forma biocida, ou seja, ativamente impactam organismos-alvo como bactérias ou invertebrados. De acordo com o estudo de Fernandez et al., (2004), não foram observados efeitos de tratamentos com doxiciclina em plantas e minhocas, além disso a toxicidade aguda em espécies aquáticas padrões é baixa. Porém, as informações disponíveis sobre a toxicidade da doxiciclina ainda é restrito e os testes padrão são realizados em condições irreais (Fernandez et al., 2004). Neste sentido, é extremamente importante o estudo ecotoxicológico da doxiciclina em peixes, pois desta forma, é possível estabelecer os possíveis riscos impactados ao meio ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ensaios de toxicidade aguda para as plantas *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* e *Wolffia brasiliensis*

Para determinação da toxicidade aguda da doxiciclina para as macrófitas *Lemna minor*, *Azolla caroliniana* e *Wolffia brasiliensis*, as plantas foram aclimatadas em sala de bioensaio com temperatura de 23,0 a 27,0 °C e iluminação constante de 1000 lux. As variáveis de qualidade de água serão pH de 8,0, condutividade elétrica de 200,0 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e oxigênio dissolvido entre 7,0 e 8,0 mg/L^{-1} , por três dias. Após aclimação (3 dias), as plantas foram desinfestadas com solução aquosa de hipoclorito de sódio 2,0% e água destilada. Em seguida, foram selecionadas quatro colônias de *L. minor* com três frondes (Figura 20A), 5 plantas de *A. caroliniana* (Figura 20B) e foram transferidas para recipiente de vidro com capacidade máxima de 100 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Hoagland's (macro e micro/nutriente) e aclimatadas por 24 horas. Para *W. brasiliensis* devido ao tamanho diminuto da planta foi amostrado uma superfície correspondente a uma área de 19 milímetros, com o auxílio de um ducto de plástico com pressão negativa realizada por uma seringa e um embolo (Pereira et al., 2019) (Figura 20C).

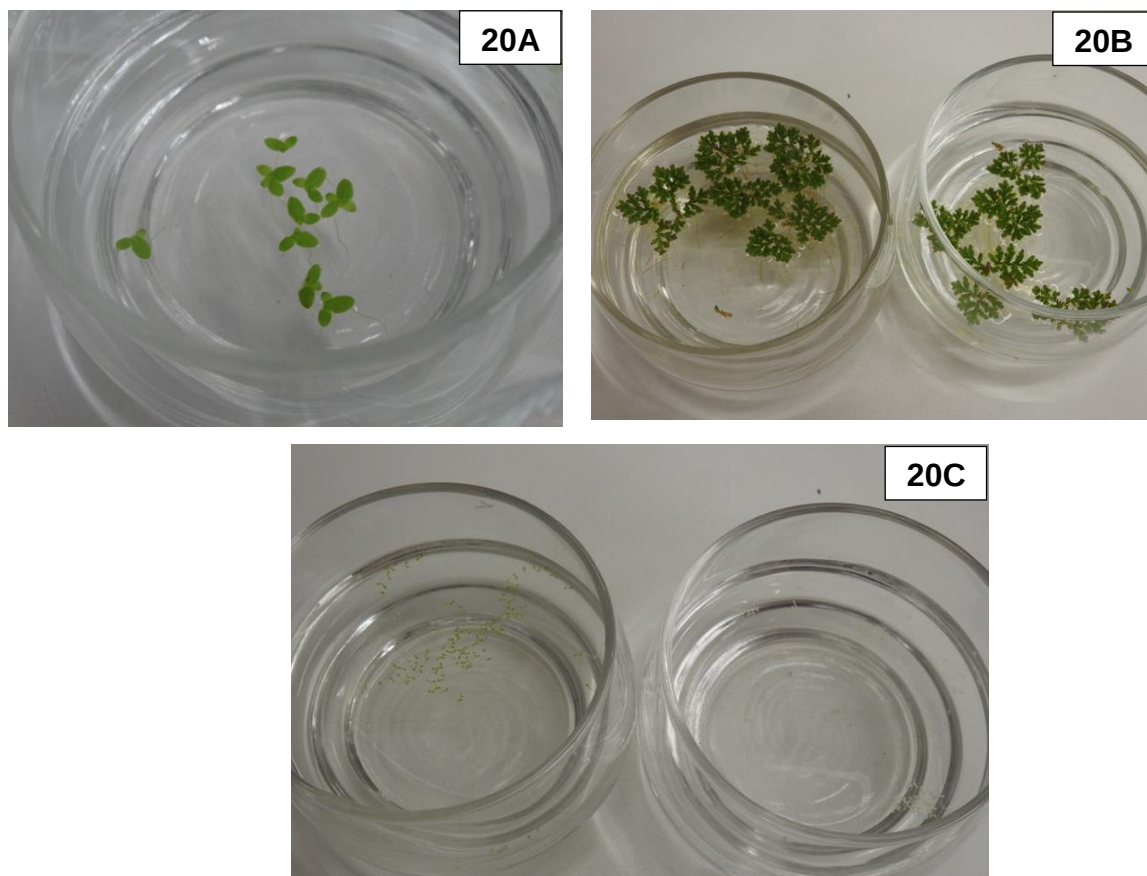


Figura 20. Bioindicadores utilizados nos ensaios de ecotoxicologia. 20A. Planta aquática *Lemna minor*. 20B. Planta aquática *Azolla caroliniana*. 20C. Planta aquática *Wolffia brasiliensis*.

Para o controle de sensibilidade, foram realizados periodicamente ensaios de toxicidade aguda com 7 dias de duração com a substância referência cloreto de sódio (NaCl - *pró analysis*) com teor de pureza de 99,9% nas concentrações de 0,009; 0,8; 1,4; 2,45; 4,2 e 7,5 g L⁻¹ para *A. caroliniana* e *W. brasiliensis*, 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 0,8 e 1,0 g L⁻¹ para *L. minor*. A seguir, foram realizados ensaios preliminares com a doxiciclina nas concentrações 0,1; 1,07; 3,4; 11,6; 36,4 e 118,0 mg L⁻¹, para determinação do intervalo de concentração em que cause de zero e 100% de mortalidade. e em seguida foi realizado os testes definitivos, com controle e três repetições para cada concentração. As avaliações foram realizadas em 3, 5 e 7 DAA, por contagem do número de frondes para *L. minor* com clorose, necrose e total das frondes (OECD, 2002) e para as outras porcentagens de mortalidade.

2.2. Ensaio de toxicidade aguda para *Hyphessobrycon eques*, *Pomacea canaliculata* e *Macrobrachium acanthurus*

Para a determinação da toxicidade aguda para *Hyphessobrycon eques* (Figura 21A), *Pomacea canaliculata* e *Macrobrachium acanthurus* os animais foram aclimatados em sala de bioensaio com temperatura de 25,0 a 27,0 °C e fotoperíodo de 12 horas de luz por dez dias, em caixa de 250 L, com sistema de aeração contínuo promovido por bombas de ar e alimentados à vontade, uma vez ao dia, os peixes e camarão com ração comercial com 28% de proteína bruta (ABNT, 2016) e o caramujo com a planta aquática *Hydrilla verticillata*.

Para o controle de sensibilidade dos organismos teste foram realizados periodicamente ensaios de toxicidade aguda com 48 horas de duração com a substância referência cloreto de potássio (KCl - *pró analisis*) com teor de pureza de 99,9%, com as concentrações de 0,10; 0,56; 1,00; 1,56 e 2,44 e 3,00 g L⁻¹. A seguir, foram realizados ensaios preliminares nas concentrações 0,1; 1,07; 3,4; 11,6; 36,4 e 118,0 mg L⁻¹, para determinação do intervalo de concentração em que cause de zero e 100% de mortalidade. Em seguida foi realizado os ensaios definitivos (3 L de água de diluição), todos com um controle e três réplicas, com três peixes por réplicas, cinco caramujos por replica (Figura 21B) e três camarões por replica. A avaliação da mortalidade foi em 24 e 48 horas após a aplicação com a retirada dos organismos mortos dos recipientes e foi mensurado também a temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) e condutividade elétrica da água (μS cm⁻²).

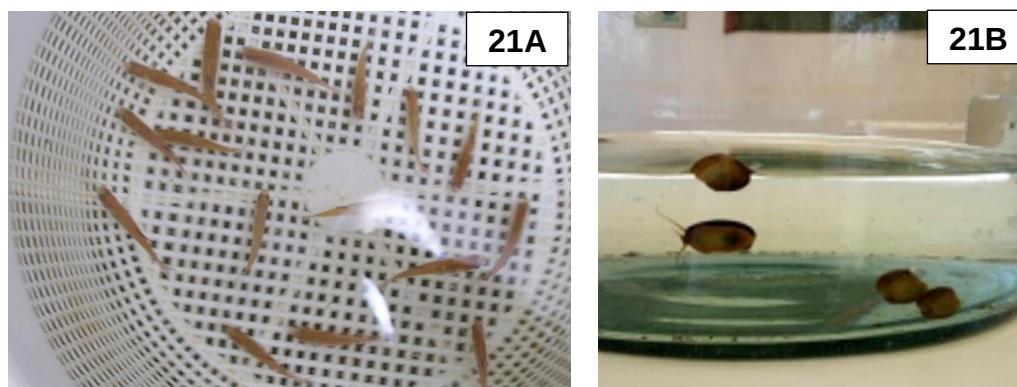


Figura 21. Bioindicadores utilizados nos ensaios de ecotoxicologia. 21A. Peixe Mato Grosso (*Hyphessobrycon eques*), 21B. Molusco *Pomacea canaliculata*.

Para garantir o bem-estar animal dos organismos utilizados nos estudos de ecotoxicologia realizados pelo Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia dos Agrotóxicos, LEEA, pertencente

ao Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, os animais sobreviventes (peixes, caramujos e camarão) após a realização dos ensaios de toxicidade foram transferidos para quarentena final, em tanques de 200 litros com fluxo de água contínuo para a garantia da qualidade de água, onde serão mantidos por três meses com alimentação diária de ração comercial. Após este período alguns lotes de animais serão utilizados em estudos prévios ou serão eutanasiados com aplicação de excesso anestésico (1,5 g de benzocaína/10L de água), para posterior descarte ou congelamento.

2.3. Avaliação do risco de intoxicação ambiental

O Risco de intoxicação ambiental é a combinação da exposição e da toxicidade do xenobiótico e foi calculado utilizando a razão entre a concentração ambiental estimada (CAE), que é a concentração/dose do fármaco utilizada no campo no tratamento, e a concentração letal CL50, obtida nos ensaios de toxicidade aguda. O valor do Q, também denominado de quociente de risco (RQ), é um número puro, pois as unidades dos parâmetros se anulam a divisão, sendo as classes de risco: $RQ > 0,5$ = Alto risco; $0,05 < RQ < 0,5$ = Médio risco e $RQ < 0,05$ = Baixo risco. A CL50 da doxiciclina foi considerada com base na maior concentração que não causou mortalidade, ou seja, 100mg L^{-1} , para todos os organismos a CAE foi de 10 mg.Kg^{-1} concentração utilizada nos ensaios de campo para tratar tilápias infectadas com *S. agalactiae* e *A. hydrophila*.

3. RESULTADOS

A CL50 de 48 horas da doxiciclina para o organismo alvo *Lemna minor*, *Azolla carolinia*, *Hyphessonobrycon eques*, *Pomacea canaliculata* e *Macrobrachium acanthurus* foram classificados como praticamente não tóxicos. Porém, antibiótico doxiciclina foi classificado como moderadamente tóxico para o organismo teste *W. brasiliensis*, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Testes ecotoxicológico realizados com Doxíciclina para diferentes organismos.

Organismos teste	Limite inferior (mg L ⁻¹)	Concentração letal 50% (mg L ⁻¹)	Limite superior (mg L ⁻¹)	Equação linear	Coefficiente de determinação (R ²)	Classificação de toxicidade
Lentilha d'água (<i>Lemna minor</i>)	-	CL50;48h > 118,0	-	-	-	Praticamente não tóxico
<i>Wolffia brasiliensis</i>	7,47	CL50;7d = 8,94	10,71	y = 9,2667x - 10,267	0,91	Moderadamente e não tóxico
Samambaia d'água (<i>Azolla carolinia</i>)	17,39	CL50;7d = 20,95	20,24	y = 6,7492x - 23,257	0,80	Praticamente não tóxico
Mato grosso (<i>Hyphessobrycon eques</i>)	-	CL50;48h > 118,0	-	-	-	Praticamente não tóxico
Caramujo (<i>Pomacea canaliculata</i>)	-	CL50;48h > 118,0	-	-	-	Praticamente não tóxico
Camarão (<i>Macrobrachium acanthurus</i>)	-	CL50;48h > 118,0	-	-	-	Praticamente não tóxico

4. DISCUSSÃO

Os antimicrobianos ainda são amplamente utilizados na criação aquicultura para prevenir e tratar doenças bacterianas, entretanto, os resíduos nas águas industriais e agrícolas não são completamente eliminados, levando ao desenvolvimento de bactérias resistentes e transmissão de genes resistentes a medicamentos, podendo ameaçar a saúde humana e o ecossistema ambiental (Zhou et al., 2022). O monitoramento de compostos não citotóxicos contra patógenos de peixes e o estudo de diferentes estratégias terapêuticas para seu tratamento estão sendo investigadas devido ao seu potencial para enfrentar esse desafio a longo prazo (Assane et al., 2021). A falta de informação sobre a ecotoxicidade de produtos químicos é um problema claro, em se espera serem resolvidos pela implementação de medidas regulatórias ou acordos voluntários com a indústria (Babín et al., 2005).

Antimicrobianos, incluindo tetraciclina e várias sulfamidas, utilizados para o tratamento de enfermidades em peixes, foram consideradas de baixa toxicidade para a espécie (Babín et al., 2005). Moraes et al. (2022) avaliaram a ecotoxicidade aguda da Amoxicilina em tilápias do Nilo, mostrando que o fármaco não apresentou efeito tóxico para espécies *Lemna minor*, *Daphnia magna* e *Oreochromis niloticus*, demonstrando a baixíssima toxicidade aguda para organismos aquáticos. Assim como Fernandez et al. (2004), que avaliou a ecotoxicologia da

Doxiciclina em dejetos de suínos, observando que o fármaco possui baixa toxicidade para organismos aquáticos e minhocas.

No presente A doxiciclina demonstrou ter baixa toxicidade para os organismos testados, isso demonstra o a segurança desse fármaco para o uso na aquicultura. Apesar de ser observado alterações em alguns parâmetros, classificando o fármaco como moderadamente tóxico para o organismo teste *W. brasiliensis*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. NBR 15088:2016. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda. São Paulo, 3a edição, 25p., 2016.
- ASSANE, I. M.; VALLADAO, G. M.; PILARSKI, F. Chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of selected plant-derived essential oils against fish pathogens. **Aquaculture Research**. v. 52, n. 2, p. 793-809, 2021.
- BABÍN, M.; BOLEAS, S.; TARAZONA, J. V. In vitro toxicity of antimicrobials on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 20, n. 1, p. 125-134, 2005.
- FERNANDEZ, C.; ALONSO, C.; BABIN, M. M.; PRO, J.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V. Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. **Science of the total environment**. v. 323, n. 1-3, p. 63-69, 2004.
- MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO FILHO, A. D. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos, 2008.
- MORAES, A. C.; ORLANDO, E. A.; ROSA PRADO, E. J.; CARVALHO, A. C. C.; MACHADO-NETO, J. G.; SIMIONATO, A. V. C.; ... BELO, M. A. A. Ecotoxicological assessment of amoxicillin trihydrate: Stability, solubility, and acute toxicity for *Oreochromis niloticus*, *Lemna minor*, and *Daphnia magna*. **Cleaner Chemical Engineering**. V. 1, p. 100005, 2022.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. *Lemna* sp. GrowthInhibition Test. In: **Guideline for testing of chemicals**, 2002.
- PEREIRA, P. C.; BRUNETTI, I. A.; CASTRO, K. S.; CHIAROTTI, L. F.; SANTOS, B. E.; MORAES, J. C.; CRUZ, C. Acute toxicity of herbicides and sensibility of aquatic plant *Wolffia brasiliensis* as a bioindicator organism. **Planta Daninha**. v. 37, 2019.

- SCHMITT, H.; RÖMBKE, J. The ecotoxicological effects of pharmaceuticals (antibiotics and antiparasitocides) in the terrestrial environment—a review. In *Pharmaceuticals in the environment*. **Springer, Berlin, Heidelberg**. p. 285-303, 2008.
- SILVA, D. C. V. R.; POMPÊO, M.; DE PAIVA, T. C. B. A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. **Ecologia de reservatórios e interfaces**. Instituto de Biociência da USP, cap, 22, 2015.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology—A new branch of toxicology: A general survey of its aims methods, and prospects. In *Ecological Toxicology Research* (pp. 3-23). Springer, Boston, MA, 1975.
- ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações (Vol. 478). E. Bertolotti (Ed.). São Carlos: RiMa, 2008.
- ZHOU, J.; YUN, X.; WANG, J.; LI, Q.; WANG, Y. A review on the ecotoxicological effect of sulphonamides on aquatic organisms. **Toxicology Reports**. v. 9, p. 534-540, 2022.

CAPÍTULO 5 – Considerações finais

O estudo imunofarmacológico da administração via oral de Doxiciclina para tilápias do Nilo (*O. niloticus*), em seu conjunto, revelou o potencial deste antimicrobiano para uso na tilapicultura, fornecendo resultados convincentes da eficácia terapêutica da doxiciclina frente a duas importantes bacterioses (*S. agalactiae* e *A. hydrophila*), revelando efeito dose-resposta para o controle das infecções experimentais, bem como na produção de anticorpos anti-*S. agalactiae* e anti-*A. hydrophila*, confirmando a hipótese de que a ação antimicrobiana da doxiciclina auxiliou os mecanismos de defesa das tilápias tratadas em ambos os estudos, principalmente na dose de 80mg/kg, além de mostrar boa margem de segurança clínica e ambiental.

Embora o mecanismo exato de aumento da resposta de anticorpos permaneça a ser elucidado, as presentes observações devem levar a uma investigação mais aprofundada do significado prático de tais fenômenos em termos de implicações e aplicações clínicas para a tilapicultura.