

Marco Shizuo Owatari

**Manutenção sanitária da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.)  
para promover o aumento da resistência contra *Streptococcus*  
*agalactiae***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Dr. José Luiz Pedreira Mouriño

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Owatari, Marco Shizuo

Manutenção sanitária da tilápia-do-nylo  
(*Oreochromis niloticus* L.) para promover o aumento  
da resistência contra *Streptococcus agalactiae* /  
Marco Shizuo Owatari ; orientador, José Luiz  
Pedreira Mouriño, 2018.

114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Piscicultura. 3. Sanidade. 4.  
Hepato proteção. 5. Biopromotores. I. Mouriño, José  
Luiz Pedreira. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.  
III. Título.

**Manutenção sanitária da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.) para promover o aumento da resistência contra *Streptococcus agalactiae***

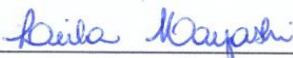
Por

MARCO SHIZUO OWATARI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.



---

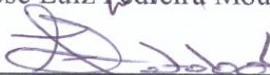
Profa. Leila Hayashi, Dra.  
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:



---

Dr. José Luiz Pedreira Mourinho – *Orientador*



---

Dr. Adolfo Jatobá Medeiros Bezerra - IFC



---

Dra. Débora Machado Fracalossi - UFSC



*Dedico este trabalho à minha mãe,  
Marlene de Fátima Owatari.*



## AGRADECIMENTOS

Um trabalho de dissertação envolve muita dedicação, tempo, planejamento, estudo e amizade. O tempo pode se tornar um amigo ou um inimigo. Isso vai depender de um planejamento bem feito e do tempo de dedicação, para que as coisas se encaminhem da melhor maneira. Não se consegue realizar um trabalho como este sem o apoio das pessoas que mais amamos, sem um braço amigo para nos ajudar, sem um grupo de pesquisa sólido e coeso.

Agradeço à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Gostaria de registrar os meus agradecimentos, sem exceção, aos integrantes do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos – AQUOS, especialmente ao farol que ilumina os caminhos do laboratório, Gabriel Fernandes Alves Jesus, para o professor Maurício Laterça Martins por sua serenidade e solicitude e ao meu orientador José Luiz Pedreira Mouriño, um entusiasta da Aquicultura que nos faz acreditar, sempre, em um futuro brilhante para essa atividade.

Aos meus amigos, deixo um beijo no coração de todos, em especial para Adriano Espíndola e Ozéas de Castro que sempre me apoiam em todos os momentos.

À Roberta Monguilhott Dalmarco, por estar ao meu lado.

Um trabalho como este é árduo, como já dito antes, porém pode se tornar mais suave quando temos o apoio das pessoas mais importantes de nossas vidas, a família. Então deixo aqui registrado o meu maior e mais importante agradecimento à minha mãe Marlene de Fátima Owatari, à minha irmã Mary Kyoko Owatari e para meu filho Zayon Owatari.





## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar novas estratégias sanitárias, por meio do uso de um biopromotor por diferentes vias de aplicação (oral, imersão e intraperitoneal) e um hepatoprotetor adicionado na ração, em tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus*, comparados com um grupo controle basal e um controle vacinado, para verificar a possibilidade de melhorias no quadro sanitário da espécie e aumento da resistência frente ao patógeno *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib. Foram utilizados 360 juvenis de tilápias-do-nilo com aproximadamente 45 dias de vida e peso médio de  $0,72 \pm 0,04$  g, mantidos em um sistema de recirculação de água durante 62 dias. Neste período, foram fracionadas diferentes doses do biopromotor em diferentes vias de aplicações. Na via oral, foram adicionados 100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L do biopromotor para cada grama de ração ofertada; para o banho de imersão foram utilizados 500 mL e 1000 mL do biopromotor diluídos em 4,5 L e 4,0 L respectivamente; para injeção intraperitoneal, 200  $\mu$ L por peixe. Para esse grupo de animais um controle positivo foi estabelecido, o qual foi vacinado com uma vacina comercial contra estreptococose. Na alimentação, 0,1% do hepatoprotetor *Di-Heptarine S*<sup>®</sup> foi incorporado à ração e ofertada durante todo o período. Outro grupo controle foi estabelecido e recebeu somente de ração comercial. Todos os peixes foram alimentados com a ração comercial *Nicoluzzi*<sup>®</sup> (40% PB) específica para tilápias. No 54º dia foram coletadas amostras para análises hematológicas, imunológicas, histológicas e enzimáticas; e no dia 55 os peixes foram desafiados com *S. agalactiae* e verificada a eficácia do biopromotor e do hepatoprotetor. Amostras para análises hematológicas, imunológicas e histológicas também foram coletadas neste período do desafio para verificar possíveis alterações fisiológicas nos peixes. Ao final do experimento foi constatado que os dois produtos proporcionaram alterações no perfil hematológico, histológico, imunológico e enzimático dos animais, desenvolvendo certa resistência contra o patógeno bacteriano, visto que ao final do desafio experimental somente os peixes do grupo controle alcançaram taxa de 100% de mortalidade.

**Palavras-chave:** Aquicultura, piscicultura, sanidade, heparo proteção, biopromotores.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate new health strategies by using a biopromoter with different application routes (oral, immersion and intraperitoneal) and a hepatoprotector added to the diet in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, compared to a control group basal and a vaccinated control, to verify the possibility of improvements in the sanitary framework of the species and increase of resistance to the pathogen *Streptococcus agalactiae* serotype Ib. 360 juveniles of Nile tilapia with approximately 45 days of life and average weight of  $0.72\pm 0.04$  g were used, kept in a water recirculation system for 62 days. In this period, different doses of the biopromoter were fractionated in different routes of application. In the oral route, 100  $\mu$ L and 200  $\mu$ L of the biopromoter were added to each gram of feed offered; for the immersion bath were used 500 mL and 1000 mL of the biopromoter diluted in 4.5 L and 4 L respectively; for intraperitoneal injection, 200  $\mu$ L per fish. For this group of animals, a positive control was established, which was vaccinated with a commercial vaccine against streptococcosis. In feed, 0.1% of Di-Heptarine S<sup>®</sup> hepatoprotector was incorporated into the diet and offered throughout the period. Another control group was established and received only commercial ration. All fish were fed commercial tilapia-specific Nicoluzzi<sup>®</sup> (40% CP) commercial feed. On day 54 samples were collected for hematological, immunological, histological and enzymatic analyzes; and at day 55 the fish were challenged with *S. agalactiae* and the efficacy of the biopromoter and hepatoprotector were checked. Samples for hematological, immunological and histological analyzes were also collected during this period of the challenge to verify possible physiological changes in the fish. At the end of the experiment it was observed that the two products provided changes in the hematological, histological, immunological and enzymatic profiles of the animals, developing some resistance against the bacterial pathogen, since at the end of the experimental challenge only the fish of the control group reached a rate of 100% mortality.

**Key words:** Aquaculture, pisciculture, sanity, hepato protection, biopromoters.



## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1: Atividade específica de enzimas antioxidantes no fígado de tilápia-do-nylo suplementada com hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina fosfatídeo) e grupo controle após 54 dias de experimento. (A) Catalase (CAT); (B) Glutathione S-transferase (GST); (C) superóxido dismutase (SOD). ..... 44

Figura 2: Gráfico da mortalidade acumulada da tilápia-do-nylo após infecção pelo patógeno bacteriano *S. agalactiae*. ..... 48

Figura 3: Imagens histológicas do intestino de tilápia-do-nylo. (A) Secção do intestino de tilápia grupo controle no 54<sup>o</sup> dia, onde é possível observar as células caliciformes e a presença de infiltrados eosinofílicos; (B) Secção do intestino de tilápia grupo hepatoprotetor no 54<sup>o</sup> dia, onde é possível observar as células caliciformes; (C) Secção do intestino de tilápia grupo controle após o desafio experimental, sendo possível observar grande quantidade de células caliciformes; (D) Secção do intestino de tilápia grupo hepatoprotetor após o desafio experimental, com células caliciformes em grande quantidade ; (E) Corte histológico do fígado em peixe do grupo controle no 54<sup>o</sup> dia, com a presença de lesões como esteatose, infiltrados eosinofílicos e necrose; (F) Corte histológico do fígado do grupo hepatoprotetor no 54<sup>o</sup> dia, é possível observar a integridade do tecido do órgão na imagem. Coloração H&E..... 56

Figura 4: Histologia do tecido hepático de tilápias-do-nylo após o desafio experimental. Na imagem é possível observar microesteatose no tecido do fígado dos peixes de ambos os grupos. A controle e B hepatoprotetor. .... 57

### ARTIGO 2

Figura 1: Atividade específica de enzimas antioxidantes no fígado de tilápia-do-nylo após 54 dias de experimento. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim

1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle. Catalase (CAT); Superóxido dismutase (SOD); Glutationa S-transferase (GST)..... 85

Figura 2: Gráfico da mortalidade acumulada da tilápia-do-nilo após infecção pelo patógeno bacteriano *S. agalactiae*. ..... 86

Figura 3: Alterações histológicas em tilápia-do-nilo após o 54º dia de experimentação. A: Tecido hepático de peixe grupo IntraVet com microesteatose; B: Infiltrados eosinofílicos (seta) e necrose (cabeça de seta) em tecido hepático de peixes grupo controle; C: Aspecto de hemosiderina em tecido do baço de peixe do grupo Alim 1; D: Esteatose no tecido do baço de peixe controle. Coloração: HH & E, Barra: 50 µm. .... 87

Figura 4: Alterações histológicas na tilápia-do-nilo após o 54º dia de experimentação. A: Secção do intestino de tilápia grupo controle, onde é possível observar as células caliciformes; B: Secção do intestino de tilápia grupo Alim 1, onde é possível observar as células caliciformes; C: Tecido de brânquia de peixe grupo Alim 2, em perfeitas condições; D: Tecido de brânquia de peixe grupo controle com congestão do veio central; E: Tecido hepático de peixe do grupo IntraCom, presença leve de infiltrado eosinofílico; F: Tecido hepático de peixe do grupo Imersão 1, onde pode ser observada a congestão de sinusoides (seta) e aspecto balonoso dos hepatócitos (cabeça de seta). Coloração: HH & E, Bar: 50 µm. .... 88

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1: Parâmetros hematológicos (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nilo após 54 dias de suplementação com o Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e controle. VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, TPP = proteína plasmática total. (\*) indicam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). ..... 45

Tabela 2: Parâmetros imunológicos séricos (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nilo após 54 dias de suplementação com Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e grupo controle. .... 45

Tabela 3: Morfometria intestinal (média  $\pm$  desvio padrão) de tilápia-do-nilo após 54 dias de suplementação com Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e grupo controle..... 46

Tabela 4: Intensidade de alterações histológicas no fígado (média  $\pm$  desvio padrão) de tilápia-do-nilo após 54 dias de suplementação com Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e grupo controle. (\*) indicam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ )..... 46

Tabela 5: Intensidade de alterações histológicas no Baço (média  $\pm$  desvio padrão) de tilápia-do-nilo após 54 dias de suplementação com Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e grupo controle..... 47

Tabela 6: Parâmetros de crescimento (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nilo após 54 dias de suplementação com o Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e controle. TCE = taxa de crescimento específica, EF = eficiência alimentar. .... 48

### ARTIGO 2

Tabela 1: Tratamentos definidos para as doses e vias de aplicação do biopromotor. T1 intraperitoneal vetanco; T2 IntraCom (intraperitoneal comercial); T3 imersão dose de 500 mL, T4 imersão dose de 1000 mL; T5 oral dose de 100  $\mu$ L e T6 dose de 200  $\mu$ L e T7 Controle ..... 72

Tabela 2: Parâmetros hematoimunológicos (média ± desvio padrão) da tilápia-do-nylo após 54 dias do experimento. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle; VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05). ..... 82

Tabela 3: Parâmetros hematoimunológicos (média ± desvio padrão) da tilápia-do-nylo após o desafio experimental com *S. agalactiae*. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle; VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05)..... 82

Tabela 4: Intensidade das alterações histológicas no fígado, baço, brânquias e intestino (média ± desvio padrão) da tilápia-do-nylo após 54 dias de experimento. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05). (0) indicam ausência de lesão. .... 83

Tabela 5: Intensidade das alterações histológicas no fígado, baço e intestino (média ± desvio padrão) da tilápia-do-nylo após desafio experimental com *S. agalactiae*. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do



biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). (0) indicam ausência de lesão..... 83

Tabela 6: Parâmetros de crescimento (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nilo após 54 dias do experimento. SGR = taxa de crescimento específica, FE = eficiência alimentar, FW = Peso Final, FL = Comprimento Final. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle. .... 86



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>23</b>
1.1. REFERENCIAL TEÓRICO .....	23
1.1.1 Aquicultura uma visão geral.....	23
1.1.2 A nutrição e o sistema imune dos peixes.....	24
1.1.3 Enfermidades na Aquicultura .....	26
1.1.4 Novas estratégias de sanidade aquícola.....	27
1.2 JUSTIFICATIVA .....	29
1.3 OBJETIVOS .....	30
1.3.1 Objetivo Geral .....	30
1.3.2 Objetivos Específicos .....	30
1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO .....	20
<b>2 ARTIGO 1</b> .....	<b>30</b>
RESUMO .....	33
ABSTRACT .....	34
2.1 INTRODUÇÃO .....	35
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
2.2.1 Delineamento experimental.....	36
2.2.2 Coleta de material.....	37
2.2.3 Análises .....	37
2.2.3.1 Análise hematológica e imunológica.....	37
2.2.3.2 Análise histológica .....	38
2.2.3.3 Análise enzimática .....	39
2.2.4 Desafio experimental.....	39
2.2.5 Desempenho zootécnico.....	40
2.2.6 Estatística.....	41
2.3 RESULTADOS .....	41
2.3.1 Parâmetros de qualidade da água .....	41

2.3.2 Parâmetros hematológicos e imunológicos .....	42
2.3.3 Histologia .....	42
2.3.4 Atividade enzimática.....	43
2.3.5 Desafio experimental com <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	43
2.3.6 Desempenho Zootécnico.....	48
2.4 DISCUSSÃO .....	49
2.5 CONCLUSÃO .....	55
AGRADECIMENTOS .....	57
REFERÊNCIAS ARTIGO 1.....	57
<b>3 ARTIGO 2</b> .....	65
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	68
3.1 INTRODUÇÃO .....	69
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	70
3.2.1 Delineamento experimental .....	70
3.2.2 Vias de aplicação do biopromotor experimental.....	71
3.2.2.1 Intraperitoneal.....	71
3.2.2.2 Imersão.....	72
3.2.2.3 Via oral.....	72
3.2.3 Coleta de material .....	73
3.2.4 Desafio experimental .....	73
3.2.5 Análises.....	74
3.2.5.1 Análise hematológica e imunológica .....	74
3.2.5.2 Análise histológica.....	75
3.2.5.3 Análise enzimática .....	76
3.2.5.4 Análise zootécnica .....	76
3.2.5.5 Estatística .....	77
3.3 RESULTADOS.....	77
3.3.1 Parâmetros de qualidade da água .....	77

3.3.2 Parâmetros hematológicos e imunológicos .....	77
3.3.3 Parâmetros histológicos.....	78
3.3.4 Atividade enzimática.....	80
3.3.5 Desafio experimental com <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	81
3.3.6 Desempenho zootécnico.....	81
3.4 DISCUSSÃO.....	89
3.5 CONCLUSÃO .....	97
AGRADECIMENTOS.....	97
REFERÊNCIAS ARTIGO 2.....	97
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>105</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>108</b>



# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Aquicultura uma visão geral

O crescimento da produção aquícola mundial de organismos aquáticos nos primeiros 16 anos no novo milênio diminuiu gradualmente e a taxa de crescimento anual média entre 2001 até 2016 foi cerca de 5,8%, o que é significativamente menor do que a taxa de crescimento observada nas décadas de 1980 (10,8%) e 1990 (9,5%). Entretanto, a aquicultura mundial apresenta crescimento constante e no ano de 2016 as estatísticas de aquicultura da FAO registraram uma produção global de 110,2 milhões de toneladas em peso vivo, com um valor total estimado 243,5 bilhões de dólares (FAO, 2018).

Existe uma variedade muito grande de espécies de animais aquáticos cultivados em todo o mundo, cerca de 598 espécies. No entanto a piscicultura é o ramo de atividade mais importante da aquicultura em termos de volume em todos os continentes. Em 2016 a atividade contribuiu com cerca de 61,7% da produção total de animais aquáticos. A aquicultura contribui cada vez mais para o abastecimento mundial de peixes e dentro deste cenário destaca-se a tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, que está entre os animais aquáticos mais cultivados no mundo. Estima-se que o cultivo da espécie esteja presente em 135 países, com produção anual de 4,2 milhões de toneladas (FAO, 2018).

No Brasil a aquicultura é uma atividade em constante crescimento, com destaque para a piscicultura continental, que é predominante e responsável por cerca de 70% de toda produção aquícola. Estima-se que a produção continental brasileira de peixes dulcícolas esteja próxima de 490 mil toneladas com destaque para as regiões Norte (6,2%), Sudeste (12,7%) e Sul (13,1%), que apresentaram aumento em suas produções em 2015. No sul do Brasil destacam-se os estados do Paraná e Santa Catarina por sua produtividade (IBGE, 2015). No ano de 2014 o estado de Santa Catarina produziu cerca de 40 mil toneladas de peixes, dos quais 67,37% foram variedades da tilápia, 25,06% de carpas, 1,87% de jundiás, 1,87% de trutas e 3,82% de outras espécies (EPAGRI, 2016).

Visando maior produtividade muitos produtores optam por intensificar a produção, utilizando densidades elevadas, muitas vezes acima da capacidade suporte de seus sistemas. O aumento na produtividade aquícola implica diretamente na necessidade de maior

estocagem de animais por metro cúbico de água nos sistemas de produção, intensificando também a oferta de alimento. Falhas no manejo alimentar, combinadas com o uso de rações inadequadas e de baixa qualidade nutricional, ocasionam alterações na qualidade da água, a perda da sanidade nas criações e o surgimento de doenças é inevitável (MORAES; MARTINS, 2004; SUBASINGHE, 2005; WU et al., 2013; KAYANSAMRUJ et al., 2014). Embora as enfermidades sejam acontecimentos naturais em todos os grupos de animais, a intensificação das criações trouxe um aumento importante no surgimento, dispersão e surto de doenças infecciosas, que as colocaram como um dos principais pontos críticos na indústria (ZAGMUTT et al., 2013).

### 1.1.2 A nutrição e o sistema imune dos peixes

A nutrição é um fator complexo que se inter-relaciona com o sistema imunológico, portanto, diretamente com a saúde dos peixes. Atualmente, na piscicultura moderna, já se sabe que é possível manter ou melhorar a saúde dos peixes por meio da oferta alimentos formulados de maneira mais nutritiva e adequada à cada espécie. Ao longo dos últimos trinta anos, indicativos científicos mostram que os nutrientes alimentares, bem como os aditivos, poderiam estimular o sistema imunológico dos peixes (KIRON, 2012).

A percepção de como nutrição está diretamente ligada ao sistema imunológico é fundamental para evitar as doenças nas criações, mantendo o crescimento normal e da saúde dos animais. Dessa maneira, numerosos fatores nutricionais e regimes alimentares, desempenham papéis fundamentais na aquicultura intensiva, podendo afetar significativamente a incidência e a gravidade de uma variedade de doenças infecciosas, pois, a oferta de nutrientes específicos para células imunes determina a eficiência da resposta imunitária contra um patógeno invasor (BLAZER, 1992; POHLENZ; GATLIN, 2014).

A perda do estado de equilíbrio do organismo em relação as funções e o estabelecimento de uma condição de defesa e/ou doença são processos metabólicos com alto consumo de energia para o hospedeiro. O estado infeccioso promove uma completa mudança nas prioridades metabólicas em relação às necessidades de nutrientes associadas ao sistema imunológico. Em células imunes quiescentes, o aproveitamento dos nutrientes ocorre em níveis basais, apenas para manutenção celular. Entretanto, durante uma resposta imune a utilização de nutrientes essenciais aumenta drasticamente. Diante desta situação, a disponibilidade adequada de nutrientes específicos exerce um papel



fundamental no aumento e no desempenho do sistema imunológico (LOCHMILLER; DEERENBERG, 2000; KIRON, 2012; POHLENZ; GATLIN, 2014).

As fontes exógenas de nutrientes devem fornecer níveis mínimos desses nutrientes específicos, para que atendam aos requisitos básicos necessários para o desempenho normal do sistema imunológico e para proteger e recuperar os tecidos de eventuais danos colaterais. Em certas situações, o fornecimento de nutrientes adicionais em níveis acima dos exigidos para manutenção e crescimento normal de peixes, ou mesmo fornecer alguns compostos que não são necessários, podem sustentar e/ou melhorar as funções do sistema imunológico, aumentando a sua eficácia contra um patógeno invasor. Neste sentido, existem várias ferramentas nutricionais que podem ser implementadas para atingir esse objetivo de aprimoramento do sistema imunológico (SEALEY; GATLIN, 1999; KIRON, 2012; POHLENZ; GATLIN, 2014).

Entretanto, dietas comerciais com formulações inespecíficas à espécie-alvo ou dietas mal formuladas, que sejam excedentes ou deficientes em vitaminas, minerais ou outros nutrientes, podem causar aumento na intensidade dos processos de oxidação, reduzindo as funções imunológicas, provocando injúrias em órgãos diretamente ligados aos mecanismos de defesa como rim, timo, fígado, intestino e baço (LANDOLT, 1989; ZAKEŞ, 2010; KOWALSKA, 2011).

Os ambientes aquáticos naturais dos peixes são diversos, desta maneira, os animais estão em constante interação com o meio adjacente e, portanto, com possíveis agentes patogênicos. Nessas condições o sistema imunológico tende a recorrer à resposta inata para a depuração de um micro-organismo invasor. Todavia, nas condições de confinamento em fazendas, essa interação com agentes infecciosos é maior, devido às práticas de criações intensivas adotadas que ocasionam o comprometimento das barreiras de defesa primárias (muco e epiderme) por meio de atritos físicos, propiciando a entrada de agentes patogênicos aos tecidos (MAGNADOTTIR, 2006; KIRON, 2012).

O Sistema imunológico dos peixes teleósteos é muito similar ao encontrado em vertebrados superiores, constituído como um mecanismo de defesa altamente complexo que utiliza uma ampla gama de componentes individuais. Evolutivamente, os peixes são considerados a primeira classe de vertebrados com imunidade inata e adaptativa, embora o último mecanismo de defesa não seja tão compreendido e elaborado como nos vertebrados superiores (WARR, 1995; TORT et al., 2003; SUNYER, 2013). É composto por duas vias principais de ação, o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. A resposta imune pode ser

dividida em três etapas: 1) Detecção e reconhecimento do patógeno, 2) Fagocitose, extermínio de patógenos e apresentação de antígenos e 3) Expansão imune e criação de memória imunológica. Durante uma resposta imune, ambas as vias (inata e adaptativa), compõem uma comunicação próxima, fundamental para uma proteção exitosa e eliminação de agentes patogênicos, por meio de um processo que envolve diversos componentes celulares e humorais de ambas as vias, incluindo neutrófilos, macrófagos, linfócitos, citosinas, imunoglobulinas, células dendríticas, sistema complemento entre outros. Quaisquer mudanças profundas na resposta imune podem ser os primeiros indícios de má nutrição (LANDOLT, 1989; TORT et al., 2003; KIRON, 2012; POHLENZ; GATLIN, 2014).

### 1.1.3 Enfermidades na Aquicultura

As doenças são responsáveis por fortes perdas econômicas em pisciculturas devido às mortalidades, morbidade, má qualidade do produto e custos associados ao uso de quimioterápicos. Os aquicultores são, portanto, os mais interessados em desenvolver estratégias de gerenciamento econômicas que possam impedir os surtos ou reduzir a gravidade das doenças (LANDOLT, 1989). Nos últimos anos, foi dada maior atenção ao desenvolvimento de estratégias nutricionais que influenciam positivamente a imunidade e a resistência dos organismos cultivados para reduzir as perdas econômicas relacionadas às doenças (POHLENZ; GATLIN, 2014).

Estima-se que no Brasil os prejuízos financeiros, diretos e indiretos, causados por infecções parasitárias e bacterianas esteja próximo de US \$ 84 milhões ao ano (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). As doenças de origem bacteriana são as principais causadoras de perdas em criações de tilápias, onde a espécie *Streptococcus agalactiae* apresenta o maior percentual de diagnósticos positivos (82%) entre as bacterioses (MSD Animal Health, 2012).

*S. agalactiae* é uma bactéria gram-positiva com predileção para infectar peixes cultivados em águas com temperaturas iguais ou superiores a 31 °C, causando septicemia, meningoencefalite, hemorragias, opacidade na córnea e escoliose. No Brasil a tilapicultura é predominante e surtos de *S. agalactiae* são os grandes causadores de doenças (PRETTO-GIORDANO et al., 2010; AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; PEREIRA et al., 2013; YI et al., 2014; MARCUSO, 2015).

Comumente as doenças bacterianas são tratadas com uso de antibióticos. Temendo grandes prejuízos, muitos produtores fazem uso

indiscriminado de antibióticos como medidas de tratamento, causando danos ao meio ambiente e selecionando possíveis cepas bacterianas resistentes. Para evitar esses efeitos, frequentemente tecnologias são testadas e desenvolvidas para o combate de doenças (JATOBA, et al., 2008; YI et al., 2014).

Devido à grande diversidade de peixes que estão sendo cultivados, diferenças consideráveis podem ser encontradas entre alguns elementos importantes do sistema imunológico. Embora essas diferenças possam ter impacto em estratégias específicas, como por exemplo o desenvolvimento de vacinas, a resposta imune global geralmente é similar entre as espécies de peixes (POHLENZ; GATLIN, 2014). Além disso, devido a existência de vários sorotipos de *Streptococcus*, o combate deste patógeno torna-se difícil e outras formas de combate às doenças bacterianas estão sendo desenvolvidas na aquicultura.

#### 1.1.4 Novas estratégias de sanidade aquícola

O uso de imunomoduladores em pisciculturas requer informações sobre fatores ambientais (componentes do hospedeiro-patógeno-meio ambiente) e o estado fisiológico do peixe (medidas de hematócrito, leucócitos, níveis de atividade de neutrófilos e fagocíticos), pois, podem determinar a capacidade do peixe para resistir a doenças. Além disso, os imunomoduladores podem induzir atividades elevadas nos mecanismos de defesa inespecíficos, como aumento da atividade oxidativa de neutrófilos, aumento de atividade de células fagocíticas ou potencialização de células citotóxicas. Nos casos em que os surtos de doenças são cíclicos e podem ser previstos, os prejuízos podem ser reduzidos ao elevar os mecanismos de defesa inespecíficos, e os imunomoduladores podem ser usados em antecipação à eventos epidêmicos para prevenção de doenças. Sendo assim, os imunomoduladores possuem um enorme potencial de uso em fazendas aquícolas para reduzir os danos causados por doenças infecciosas, principalmente nas fases iniciais da vida dos peixes (ANDERSON, 1992; MAGNADOTTIR, 2006).

A melhora do sistema imunológico dos peixes é comprovada quando tratados a partir de princípios ativos de plantas como manjeriço, gengibre, cominho, adicionados à dieta (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; YILMAZ et al., 2013; SHAKYA, 2015; BRUM et al., 2017). Os constituintes ativos podem fortalecer ou estimular a resposta imune ao interagir com vários parâmetros do sistema imunológico como atividade de peroxidase, lisozima, níveis totais de proteína, albumina e globulina,

causando efeito imunoestimulante ou atividade imunoestimulatória nos animais (AHMADI et al., 2012).

Plantas e ervas têm seus princípios ativos utilizados para tratamentos e prevenção de enfermidades há séculos, sendo o cardo mariano *silybum marianum*, uma das plantas mais utilizadas em pesquisas relacionadas ao tratamento de doenças e distúrbios de origem hepática. *S. marianum* é membro da família Asteraceae. Morfologicamente o cardo mariano tem um caule de 40-200 cm de altura, glabro e ramificado na parte superior da planta. As folhas basais são alternadas, grandes e glabras com margens espinhosas. As folhas podem ter 50 a 60 cm de comprimento e 20 a 30 cm de largura. Uma característica distinta do cardo mariano são as veias brancas do leite. As folhas do caule são menores. Cada haste termina em uma cabeça de flor com cerca de 5 cm de diâmetro, de cor vermelho-púrpura. As sementes com 5 a 8 mm de comprimento, peso de 30g/1000 sementes. O cardo mariano é nativo da bacia do Mediterrâneo e disseminado em todo o mundo. As sementes foram usadas por mais de 2000 anos para tratar doenças do fígado. As propriedades fitoterápicas desta planta estão ligadas à silimarina, que é uma mistura de três fenóis naturais denominados flavonolignanas (silibina, silidianina e silicristina), estando nas suas sementes a maior concentração de silimarina (KARKANIS et al., 2011).

Muitas pesquisas já foram desenvolvidas utilizando a silimarina para verificação dos efeitos em fígados de ratos e humanos (FLORA et al., 1998; JACOBS et al., 2002; SINGH et al., 2014). No campo da aquicultura os estudos relacionados à silimarina e seus efeitos são recentes e há poucos relatos disponíveis (XIAO et al., 2017).

Paralelamente, os biopromotores também são uma estratégia dentro da aquicultura e estão entre as abordagens mais viáveis para prevenir doenças de peixes nesse ramo de atividade. É um método amplamente aceito e eficaz para prevenir a maioria das doenças patogênicas, entre elas a infecção por *S. agalactiae*, prevenindo as mortalidades em massa de tilápias. Têm como objetivo proporcionar uma resposta imunitária forte a um antígeno administrado, que seja capaz de produzir proteção contra o patógeno a longo prazo (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; LIU et al., 2016).

A extensão da resposta imunitária dos peixes está relacionada às condições fisiológicas do animal, dos métodos de preparo dos biopromotores, das doses e das vias de aplicações. Alguns fatores, como temperatura, duração e número de aplicações, tamanho do peixe e dose de desafio, não podem ser ignorados. Geralmente os peixes podem ser imunizados por injeções intraperitoneais, via oral ou banhos de imersão;

tendo cada um destes métodos as suas vantagens e desvantagens em relação ao nível de proteção, efeitos secundários, praticidade e rentabilidade (GUDDING et al., 1999; LI et al., 2015; LIU et al., 2016).

Por razões práticas, os banhos de imersão e vacinas orais são convenientes para os peixes, especialmente para larvas e juvenis. No entanto, a eficiência protetora geralmente não é tão boa quanto a injeção intraperitoneal nas mesmas condições. A vacina pode ser parcialmente degradada pelos fluidos digestivos quando administrada por via oral, ou pode não ser suficientemente absorvida pelo corpo do peixe utilizando os métodos de imersão (CAIPANG et al., 2014)

No mercado mundial há vacinas disponíveis em 40 países para mais de 17 espécies de peixes, sendo 22 para prevenção de bacterioses. Apesar deste panorama mundial, a vacinação não é uma prática comum em países como a China, por exemplo, que é um gigante mundial da aquicultura (BRUDESETH et al., 2013). No Brasil a prática de vacinação é emergente, contudo, a prevenção de doenças se faz necessária para evitar perdas econômicas severas (EMBREGTS; FORLENZA, 2016). Embora, a maioria das vacinas contra patógenos bacterianos tenham se demonstrado eficientes, os esforços de pesquisa ainda são necessários para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de vacinas ou produtos similares que possam ser utilizados na aquicultura e que sejam verdadeiramente eficazes para os peixes teleósteos (CAIPANG et al., 2014).

Dessa forma, pesquisas que visem o desenvolvimento de novas tecnologias, produtos e estratégias que possibilitem incremento na resistência da tilápia-do-nilo frente ao patógeno *S. agalactiae* tornam-se necessárias e indispensáveis, permitindo assim, o crescimento sustentável da piscicultura brasileira.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A piscicultura continental é uma atividade econômica em várias regiões do Brasil, com destaque para criação da tilápia nilótica. Entretanto, doenças como as bacterioses são muito comuns nesses sistemas de cultivos e surtos de mortalidades são frequentes nas propriedades. A aplicação de biopromotores já é uma realidade no setor piscícola brasileiro, com resultados relevantes nas taxas de sobrevivência dos animais tratados nas regiões afetadas por surtos de estreptococose, aumentando consideravelmente a lucratividade dos produtores, além de reduzir danos ao ambiente pela não utilização de quimioterápicos. Atualmente muitas indústrias do segmento de saúde animal buscam

inserção no mercado aquícola para encontrar soluções de cunho sanitário, por ser este um mercado praticamente inexplorado no setor e muito amplo para desenvolvimento de novos produtos. Dessa forma, torna-se importante a realização de pesquisas científicas que avaliem e validem o uso de novos produtos para tilápias no combate à *S. agalactiae*.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo Geral

Contribuir com avanços tecnológicos no combate às doenças bacterianas, testando em tilápias nilóticas o uso de biopromotores para aumento de resistência contra *S. agalactiae*.

#### 1.3.2 Objetivos Específicos

a) avaliar diferentes vias de aplicações dos biopromotores: oral, imersão, intraperitoneal e na dieta de tilápias;

b) testar a eficácia da imunoestimulação por meio de desafio experimental frente ao patógeno bacteriano;

c) verificar possíveis alterações no perfil hematoimunológico, enzimático, bem como nos órgãos dos animais, com análises histológicas;

d) avaliar os parâmetros zootécnicos dos animais ao final do experimento.

### 1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO

A introdução geral está formatada conforme as normas da ABNT. O artigo 1 está formatado conforme as normas da revista *Aquaculture*. O artigo 2 está formatado conforme as normas da revista *Fish Physiology and Biochemistry*.

## 2 ARTIGO 1

“Sylimarin as hepatic protector and immunomodulator in Nile tilapia during *Streptococcus agalactiae* infection”

Marco Shizuo Owatari<sup>a</sup>, Gabriel Fernandes Alves Jesus<sup>a</sup>, Aline Brum<sup>a</sup>, Scheila Anelise Pereira<sup>a</sup>, Nicollas Breda Lehmann<sup>a</sup>, Ulisses de Pádua Pereira<sup>b</sup> Maurício Laterça Martins<sup>a</sup>, José Luiz Pedreira Mouriño<sup>a</sup>

<sup>a</sup>AQUOS – Laboratório de Saúde dos Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (CCA, UFSC), Rodovia Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Bacteriologia em Peixes (LABBEP), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

\*Corresponding author. Tel: +55 48 996690814

E-mail address: owatarimarco@hotmail.com





## RESUMO

O presente estudo investigou o uso da silimarina, um extrato obtido a partir do Cardo Mariano *Silybum marianum*, e seus efeitos hepatoprotetores e imunomoduladores em tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus*. A silimarina foi utilizada como aditivo alimentar adicionado à ração com teor de 0,1 % (1 kg/tonelada de ração) com o produto Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% Silymarin phosphatide). Um total de 90 juvenis de tilápia com aproximadamente 45 dias de vida e peso médio de  $0,72 \pm 0,04$  g, que foram divididos em dois grupos. Um alimentado com ração contendo o hepatoprotetor e outro com ração sem o aditivo. No 54º dia do experimento foram coletadas amostras para análises hematológicas, imunológicas, histológicas e enzimáticas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST). Ao final do ensaio (aos 55 dias após a suplementação) os peixes foram desafiados para verificar os efeitos da silimarina sobre os parâmetros do sistema imune, bem como a resistência dos animais diante da bactéria *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib. Durante o desafio outra amostra de material biológico foi realizada para análises hematológicas, imunológicas, histológicas. Aumento no número de trombócitos foi encontrado para o grupo tratado, ao contrário do grupo controle. No fígado dilatação dos sinusoides o grupo tratado teve maior intensidade, enquanto o controle teve intensidade mais severa. Nenhuma alteração significativa foi encontrada em SOD, CAT e GST entre os grupos. As alterações histopatológicas, provavelmente, foram provocadas por toxinas de origem bacteriana como resposta dos processos inflamatórios. A degeneração periacinar foi menos intensa no grupo controle, enquanto no grupo tratado foi maior. Entretanto os infiltrados eosinofílicos e linfocitários ocorreram somente no grupo controle. A sobrevivência no grupo alimentado com a ração contendo silimarina alcançou a sobrevivência de 28%, enquanto no grupo controle não foi observada sobrevivência. Com base nesses resultados, constatamos que a silimarina desenvolveu efeitos hepatoprotetores em tilápias-do-nylo.

Palavras-chave: peixe, hepato proteção, estresse oxidativo, cardo mariano, imunoestimulação, estreptococose, trombócito; dilatação de sinusóide; infiltrado eosinofílico; infiltrado linfocitário.

## ABSTRACT

The present study investigated the use of silymarin, an extract obtained from *Cardo Mariano Silybum marianum*, and its hepatoprotective and immunomodulating effects on Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Silymarin was used as a feed additive added to the feed containing 0.1% (1 kg / ton of feed) with Di-Heptarine S® (16% Silymarin phosphatide). A total of 90 juveniles of tilapia with approximately 45 days of life and average weight of  $0.72 \pm 0.04$  g, which were divided into two groups. One fed with feed containing the hepatoprotector and another with feed without the additive. On the 54th day of the experiment, samples were collected for hematological, immunological, histological and enzymatic analyzes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST). At the end of the test (55 days after supplementation) the fish were challenged to verify the effects of silymarin on the parameters of the immune system, as well as the resistance of the animals to *Streptococcus agalactiae* serotype Ib. During the challenge another sample of biological material was performed for haematological, immunological, and histological analyzes. Increased numbers of thrombocytes were found for the treated group, unlike the control group. In the liver dilatation of the sinusoids the treated group had greater intensity, while the control had more severe intensity. No significant change was found in SOD, CAT and GST between the groups. Histopathological changes were probably caused by toxins of bacterial origin as a response to inflammatory processes. Periacinar degeneration was less intense in the control group, while in the treated group it was higher. However, eosinophilic and lymphocytic infiltrates occurred only in the control group. Survival in the group fed the silymarin-containing diet achieved a survival rate of 28%, whereas no survival was observed in the control group. Based on these results, we found that silymarin developed hepatoprotective effects on Nile tilapia.

Key words: fish, hepato protection, oxidative stress, milk thistle, immunostimulation, streptococcosis, thrombocyte; sinusoidal dilatation; eosinophilic infiltrate; lymphocytic infiltrate.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de compostos endógenos e exógenos e, portanto, um dos primeiros órgãos alvo para a ação tóxica de estressores (Cao et al., 2016). Diversos são os motivos pelos quais os animais durante seu cultivo podem apresentar danos hepáticos, dentre eles se ressalta o excesso de carboidratos nas dietas comerciais de peixes, um surto bacteriano e/ou mesmo um tratamento com antibiótico (Zaki et al., 2011; Azazza et al., 2015).

No ramo da piscicultura poucos relatos sobre a aplicação de hepatoprotetores estão disponíveis. Entretanto alguns estudos mostram que a suplementação de silimarina pode melhorar o crescimento e a eficiência de absorção da proteína inserida na dieta, suprimindo o acúmulo de lipídios, bem como melhorar o estado de saúde da Carpa Capim (*Ctenopharyngodon idellus*) alimentada com dietas com alto teor lipídico, o que pode estar associado ao aumento da lipólise e da  $\beta$ -oxidação, capacidade antioxidante (Xiao et al., 2017), na truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) síntese proteica em tecido hepático e fortalece o sistema imunológico (Banaee et al., 2011; Ahmadi et al. 2012) e no salmão do Atlântico (*Salmo salar*) fortalece a capacidade de estresse antioxidativo (Sanchez et al., 2016).

As Plantas e ervas têm seus princípios ativos utilizados para tratamentos e prevenção de enfermidades há séculos, sendo o cardo mariano *Silybum marianum*, uma das plantas mais utilizadas em pesquisas relacionadas ao tratamento de doenças e distúrbios de origem hepática. As propriedades fitoterápicas desta planta estão ligadas à silimarina, que é uma mistura isomérica de flavonolignanas ativas, incluindo a silibinina A e B, a isosilibinina A e B e a silidianina, estando nas suas sementes a maior concentração de silimarina (karkanis et al., 2011; Colturato et al. 2012).

A silimarina nos últimos anos recebeu uma atenção maior devido às suas propriedades fitoterápicas sendo empregada como antioxidante devido aos seus efeitos anti-lipídicos peroxidativos e anti-inflamatórios no tratamento de várias doenças hepáticas em humanos (hepatites, cirrose e outras doenças), considerada em muitos casos, como uma ação hepatoprotetora (Flora et al., 1998; Jacobs et al., 2002).

Esta pode atuar na eliminação direta de radicais livres como  $Fe^+$  e  $Cu^+$  no intestino, prevenir a formação de radicais livres inibindo enzimas produtoras de EROs (oxigênio reativo específico), ativar enzimas antioxidantes, estimular vitagenes responsáveis pela síntese de

moléculas protetoras, pode atuar no microambiente do intestino através de interações silimarina-bactérias.

Portanto na estratégia de prevenção de doenças em animais, a silimarina pode ter efeitos hepatoprotetores semelhantes, tal como descritos na nutrição humana (Jacobs et al., 2002; Singh et al., 2014; Surai, 2015; Xiao et al., 2017).

Apesar de alguns estudos estarem disponíveis na literatura, não há informação disponível sobre os possíveis efeitos da silimarina, utilizada como suplemento alimentar, em diferentes parâmetros sanitários de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da administração oral de silimarina incorporada à ração, em alguns parâmetros hematológicos, imunológicos, histológicos e antioxidantes de tilápias-do-nilo e realizar um enfrentamento do patógeno *Streptococcus agalactiae* ao final do período experimental, bem como avaliar o desempenho zootécnico dos animais.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o procedimento experimental realizado nesta pesquisa com os animais foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais e protocolo CEUA nº 9594280417.

### 2.2.1 Delineamento experimental

O experimento foi iniciado com alevinos de tilápias-do-nilo com peso médio inicial de  $0,72 \pm 0,04$  g e conduzido durante 62 dias. Um total de 90 juvenis foram distribuídos em 6 unidades experimentais de 80 L, totalizando 15 animais por tanque. Os peixes foram aclimatados durante dois dias e divididos casualmente em dois tratamentos com triplicatas. As unidades experimentais estavam dispostas em um sistema de recirculação de água com filtro físico e biológico conforme Owatari et al. (2018), aquecimento central de água, aeração, além de tratamento por radiação ultravioleta (UV). A iluminação artificial com fotoperíodo de 12 h. Diariamente foram monitorados o oxigênio dissolvido, pH e temperatura. A amônia total e tóxica, nitrito e alcalinidade duas vezes por semana. Para realização do experimento, foi utilizada ração comercial da marca Nicoluzzi® (40 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta, 125 g kg<sup>-1</sup> de umidade, 50 g kg<sup>-1</sup> de extrato etéreo e 35 g Kg<sup>-1</sup> de fibra bruta) capaz de atender as exigências nutricionais da tilápia-do-nilo.

A silimarina foi incorporada à dieta na proporção de 0,1% (1 kg/ton) por meio do produto *Di-Heptarine S*® (Silymarin phosphatide

16%). A dosagem utilizada foi estabelecida em testes *in vitro* realizados por Sanchez et al. (2016), onde esta concentração foi capaz de gerar proliferação celular de leucócitos de *Salmo salar*.

Um grupo recebeu a ração com o aditivo à base de silimarina e o grupo controle recebeu somente ração comercial durante o período experimental. Os peixes foram alimentados a uma taxa inicial de 16% da biomassa (ração em pó) e terminando em 6% da biomassa (ração 2,6 mm). A ração foi dividida em 5 porções e fornecida ao longo do dia em intervalos de 2 h.

### 2.2.2 Coleta de material

Duas coletas de material biológico foram realizadas. A primeira foi efetuada no 54º dia após o início do ensaio, para verificar o estado da integridade dos animais antes da infecção. No 55º dia de experimentação os peixes foram desafiados com *S. agalactiae*. A segunda coleta ocorreu entre o 56º e 62º dia do ensaio. Foram coletadas amostras para análises hematológicas, imunológicas e histológicas em ambos os momentos e para análises enzimáticas somente do período pré-infecção. Os peixes foram submetidos a procedimento anestésico profundo com eugenol e a retirada do material para as análises foi feita de maneira asséptica para que não ocorresse contaminação cruzada entre os tratamentos.

### 2.2.3 Análises

#### 2.2.3.1 Análise hematológica e imunológica

O sangue foi coletado por punção do vaso caudal com seringas de insulina contendo anticoagulante para contagem de eritrócitos total e diferencial da série branca. O sangue foi utilizado para a confecção de extensões sanguíneas em duplicata e coradas com MayGrunwald/Giemsa/Wright - MGGW (Ranzani-Paiva et al., 2013) para a contagem diferencial de leucócitos, bem como contagem total de leucócitos (WBC) e trombócitos pelo método indireto, segundo Ishikawa et al. (2008). Uma alíquota foi usada para a determinação do hematócrito (Ranzani-Paiva et al., 2013) e o restante para quantificação do número total de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer após diluição 1:200 em solução Dacie.

A concentração de hemoglobina foi analisada pelo método da cianometahemoglobina (Collier, 1944). Equações hematimétricas foram

utilizadas para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Wintrobe, 1934).

Para análises imunológicas foi realizado um “pool” do sangue de três peixes, sem anticoagulante, por unidade experimental. O sangue após coagulado foi centrifugado a 1.400 g durante 10 min para retirada do soro e armazenamento a -20 °C para análises imunológicas de atividade de lisozima (Sankaran; Gurnani, 1972), proteína total (LabTest®), concentração de imunoglobulina total (Amar, 2000) e título da atividade aglutinante do soro (Silva et al., 2009).

Para verificação da atividade antimicrobiana do soro, um inóculo da *S. agalactiae* foi crescido em BHI a 32 °C por 24 h, preparados na concentração de 0,5 na escala de *Macfarland* e diluído em meio de cultura pobre (PB, do inglês *Poor Broth*) 100.000 vezes. Posteriormente foi realizada diluição seriada do soro em meio PB no fator 1:2 até o 12° poço. Para controle positivo e branco, solução salina foi diluída em PB, da mesma forma que o soro. Finalmente, 20 µL da bactéria foi adicionado em cada poço da amostra diluída do soro e do controle positivo. A microplaca contendo *S. agalactiae* foi incubada a 32 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana do soro foi recíproca à última diluição que apresentou atividade bactericida.

### 2.2.3.2 Análise histológica

Para avaliação histológica foram coletadas amostras do fígado, intestino e baço de quatro peixes no 54° dia de experimentação e de três peixes após o desafio com o patógeno bacteriano. As amostras foram fixadas em formalina 10%. Posteriormente as amostras foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de álcool etílico, clarificadas em xilol e incluídas em parafina a 60 °C para cortes de 4 µm de espessura (micrótomo PAT- 54 MR10) e coloradas com Hematoxilina-Eosina (H&E). Posteriormente as lâminas foram montadas em meio *Entellan*® e analisadas em microscópio de contraste de interferência de fase (DIC) *Axio Imager A.2* com o software *Zen Pro* (Zeiss, Göttingen, Alemanha).

Para todos os órgãos, atribuiu-se valores às alterações histológicas, conforme o grau de intensidade: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25% da área do órgão), 2 (alteração moderada, 25% a 50% da área do órgão) e 3 (alteração severa, mais de 50% da área do órgão), de acordo com o método descrito por Schwaiger et al. (1997), ligeiramente modificado por Brum et al. (2018).

No fígado, considerou-se como alterações histopatológicas a perda do aspecto cordonal, perda da estrutura no pâncreas, hepatócito balonoso, congestão nos grandes vasos, congestão nos sinusoides e no pâncreas, dilatação sinusoidal, hipertrofia dos hepatócitos, infiltrado eosinofílico, infiltrado linfocitário, hipertrofia do núcleo dos hepatócitos, macroesteatose, microesteatose, necrose, núcleos com picnose e perda do núcleo dos hepatócitos. Na morfologia intestinal, foram medidos a altura de vilos, largura de vilos, bem como a quantificação dos vilos e células caliciformes, infiltrado eosinofílico e infiltrado linfocitário. No baço, considerou-se os centros de melanomacrófagos, melanomacrófagos, congestão de vasos, infiltrado eosinofílico, infiltrado linfocitário, esteatose e aspecto de hemossiderina.

### 2.2.3.3 Análise enzimática

Para verificação da atividade enzimática, foram realizadas análises de quantificação de algumas enzimas de estresse oxidativo, como superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) no fígado de animais tratados com hepatoprotetor e grupo controle. Para isto, foi realizado um *pool* de partes do tecido hepático de quatro animais, totalizando 100 mg de tecido por amostra. O tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mM, KCl 0,15 M, PMSF 100  $\mu$ M, pH 7,4, na proporção de 1 g de tecido para 5 mL de tampão (1:5). O homogeneizado foi centrifugado a  $9000\times g$  por 30 minutos a 4 °C. As análises enzimáticas foram realizadas a partir da fração sobrenadante.

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada conforme Aebi (1984), a qual mede a velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima através do decréscimo de absorvância a 240 nm ( $\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a 25 °C. A determinação da atividade da glutathione S-transferase (GST) foi realizada segundo Keen et al. (1976), fundamentado na velocidade de formação do conjugado CDNB-GSH (1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno), realizando uma leitura em espectrofotômetro a 340 nm, durante 2 minutos. A atividade superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com a metodologia descrita por McCord e Fridovich (1969).

### 2.2.4 Desafio experimental

Os peixes foram alimentados durante 54 dias até atingirem o peso aproximado de 50 g, peso no qual os animais estão mais suscetíveis às doenças, conforme Mian et al. (2009). No 55º dia do experimento os

peixes de ambos os grupos, hepatoprotetor e controle, foram desafiados com o patógeno bacteriano *S. agalactiae* sorotipo Ib, cepa isolada por Facimoto et al. (2017), de surtos de mortalidade em tilapiculturas no norte do estado do Paraná.

Foi realizada a dose letal 50 (DL<sub>50-96h</sub>) para verificar a concentração de bactéria ideal para realizar o desafio. Para isso, 40 animais foram distribuídos em 8 unidades experimentais de 30 L, com aeração e temperatura controlada, totalizando cinco animais por unidade experimental. A DL<sub>50</sub> foi realizada em duplicata e as doses testadas foram:  $1 \times 10^5$ ;  $1 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. O *S. agalactiae* foi cultivado em meio de cultura BHI (HiMedia, Índia) a 32 °C durante 24 h. A cultura foi centrifugada a 1.500 G 10 min<sup>-1</sup> e o sobrenadante descartado. O precipitado bacteriano foi ressuspenso em PBS (*phosphate buffered saline*). Após a verificação da concentração das bactérias no inóculo ajustado pela curva de crescimento (concentração bacteriana x absorbância) previamente realizada, a diluição foi realizada para atingir a concentração ideal para o desafio. A infecção experimental foi realizada via injeção intraperitoneal de 100 µL de *S. agalactiae* por peixe, na concentração de  $1 \times 10^7$ . O controle negativo foi composto, em triplicata, por animais injetados com solução de PBS e tratados de forma semelhante. A temperatura da água nos tanques foi elevada até 31 °C.

Foram observados os sinais clínicos e coletadas as amostras quando da mortalidade de 50% do lote e/ou estabilização da curva de mortalidade. Fragmentos de fígado, rim e cérebro foram coletados assepticamente para reisolamento da bactéria (postulado de Koch). As amostras foram colocadas em tubos contendo meio líquido BHI (*HiMedia*, Mumbai, Índia) para crescimento. Posteriormente, o conteúdo foi plaqueado em meio ágar tripton de soja (*HiMedia*) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e as placas foram incubadas a 32 °C por 24 h para visualização e caracterização das colônias de *S. agalactiae*.

Os peixes passaram por procedimento anestésico com eugenol para realização do procedimento. O inóculo utilizado no desafio experimental somente continha a cepa bacteriana, sem a presença de metabólitos produzidas durante seu preparo.

### 2.2.5 Desempenho zootécnico

Ao final do experimento foram avaliados os parâmetros de crescimento específico (TCE), eficiência alimentar (EA) e sobrevivência calculados de acordo com Fu et al. (1998).



$$TCE (\% \cdot dia^{-1}) = \left[ \frac{(\text{Log}(\text{peso final}) - \text{Log}(\text{peso inicial}))}{\text{dias de cultivo}} \right] \times 100$$

$$EA = \left[ \frac{(\text{Biomassa final} - \text{Biomassa inicial})}{\text{Ração ofertada}} \right]$$

$$\text{Sobrevivência} = \left[ \frac{(\text{População inicial} - \text{População final})}{\text{População inicial}} \right] \times 100$$

### 2.2.6 Estatística

O experimento foi projetado com um delineamento inteiramente casualizado para testar diferenças significativas nas médias dos tratamentos. Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Os valores médios dos dados foram comparados pelo teste de Levene para verificar a homocedasticidade e, em seguida, o teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a normalidade dos dados. Os dados sem homogeneidade foram transformados em  $\log_{10}(x + 1)$ . Um teste t de Student foi usado em 5% significância para verificar a diferença entre os grupos utilizando o *software Statistica*®. Nos casos em que os pré-requisitos não foram atendidos (dados de intensidade das lesões histológicas), utilizou-se teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido de teste de *Dunn* para comparação de médias. Todos os resultados obtidos antes do desafio foram analisados em separado dos dados obtidos após o desafio.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Parâmetros de qualidade da água

As condições de experimentação mantiveram-se dentro dos padrões esperados para a manutenção da espécie em cativeiro (Popma et al., 1996). As variáveis de qualidade da água permaneceram estáveis e apresentaram as seguintes médias e desvios durante o ensaio: temperatura  $28,68 \pm 0,84$  °C; pH  $6,86 \pm 0,31$ ; amônia total  $0,55 \pm 0,91$  mg L<sup>-1</sup>; nitrito  $0,17 \pm 0,12$  mg L<sup>-1</sup>; alcalinidade  $26,88 \pm 15,12$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> e oxigênio dissolvido  $6,60 \pm 0,45$  mg L<sup>-1</sup>.

### 2.3.2 Parâmetros hematológicos e imunológicos

Após 54 dias de suplementação com o hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup>, foi observado que a quantidade de trombócitos foi mais elevada ( $p=0,0013$ ) nos peixes alimentados com o hepatoprotetor, diferindo do grupo controle, evidenciando uma possível proliferação celular nos peixes. No entanto, não foram observadas alterações significativas ( $p>0,05$ ) nos outros elementos hematológicos. Após o desafio com o patógeno bacteriano *Streptococcus agalactiae*, não foi observada nenhuma diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre o grupo hepatoprotetor e grupo controle (Tabela 1).

Os níveis plasmáticos de proteína total, imunoglobulinas, título de aglutinação e antimicrobianos não apresentaram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os dois grupos aos 54 dias de experimento, bem como após o desafio com a bactéria *S. agalactiae* (Tabela 2).

### 2.3.3 Histologia

Após 54 dias de suplementação com o hepatoprotetor *Di-Heptarine S<sup>®</sup>* não foi verificada diferença significativa ( $p>0,05$ ) na morfometria do intestino. O comprimento, largura e número de vilos, quantidade de células calciformes e o grau de lesões (infiltrados eosinofílicos) foram semelhantes ao grupo controle (Tabela 3).

No fígado (Tabela 4), aos 54 dias de suplementação, os peixes alimentados com a dieta contendo o hepatoprotetor apresentaram dilatação dos sinusoides menos intensa, diferindo do grupo controle ( $p=0,0258$ ) que apresentou maior grau da lesão. A intensidade das lesões quanto a manutenção do aspecto cordonal do órgão, degeneração periacinar, aspecto balonoso dos hepatócitos, congestão nos grandes vasos, congestão nos sinusoides e no pâncreas, infiltrado eosinofílico, infiltrado linfocitário, hipertrofia dos hepatócitos, hipertrofia do núcleo dos hepatócitos, macroesteatose, microesteatose, necrose, núcleos com picnose e perda do núcleo dos hepatócitos foram iguais entre os dois grupos não apresentando diferença significativa ( $p>0,05$ ).

Após a infecção, a intensidade das lesões com relação à manutenção do aspecto cordonal do órgão, aspecto balonoso dos hepatócitos, congestão nos grandes vasos, congestão nos sinusoides e no pâncreas, dilatação dos sinusoides, hipertrofia dos hepatócitos, hipertrofia dos hepatócitos, hipertrofia do núcleo dos hepatócitos, macroesteatose, microesteatose, necrose, núcleos com picnose e perda do núcleo dos hepatócitos, não revelou diferenças significativas ( $p>0,05$ ) em

comparação com o controle. Entretanto, o grupo tratado com o hepatoprotetor apresentou maior intensidade na perda na estrutura do pâncreas, evidenciando diferença significativa ( $p=0,0287$ ) quando comparado ao grupo controle. Os Infiltrados eosinofílicos ( $p=0,0001$ ) e linfocitários ( $p=0,0224$ ) apresentaram diferenças significativas entre os grupos, sendo mais intensas no grupo controle.

As alterações histológicas no baço (Tabela 5) aos 54 dias de suplementação com o hepatoprotetor não evidenciaram nenhuma diferença significativa ( $p>0,05$ ) quando comparadas ao grupo controle, tanto antes, quanto após o desafio experimental com a bactéria *S. agalactiae*.

#### 2.3.4 Atividade enzimática

Ao final do período de 54 dias de experimento as análises indicaram que a suplementação alimentar com o hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> não alterou as atividades das enzimas antioxidantes CAT, GST e SOD. Não foi constatada nenhuma diferença estatística ( $p>0,05$ ) na atividade das enzimas em comparação ao grupo controle (Figura 1). A Catalase  $87,21\pm 30,37$  U/mg proteína para o grupo tratado e  $78,76\pm 17,18$  U/mg proteína para o controle; Glutathione S-transferase  $2,27\pm 0,27$  U/mg proteína para o grupo tratado e  $2,30\pm 0,29$  para o controle; Superóxido dismutase  $49,97\pm 3,30$  U/mg proteína para o grupo tratado e  $56,79\pm 9,62$  para o grupo controle.

#### 2.3.5 Desafio experimental com *Streptococcus agalactiae*

Após 24 horas de desafio foram observadas mortalidades agudas em ambos os grupos. No decorrer das horas subsequentes as mortalidades foram anunciadas pela manifestação dos sinais clínicos característicos da estreptococose, tais como, letargia, opacidade da córnea, exoftalmia, natação errática, perda do apetite, anorexia, equimose, hemorragias. Internamente os animais apresentaram ascite, petéquias no fígado e liquefação dos órgãos (Soto et al., 2016). Ao final do período de 192 h, não houve diferença significativa entre os grupos em relação a sobrevivência (Figura 2) ( $p>0,05$ ).

Figura 1: Atividade específica de enzimas antioxidantes no fígado de tilápia-do-nylo suplementada com hepatoprotetor Di-Heptarine S® (16% silimarina fosfatídeo) e grupo controle após 54 dias de experimento. (A) Catalase (CAT); (B) Glutaciona S-transferase (GST); (C) superóxido dismutase (SOD).

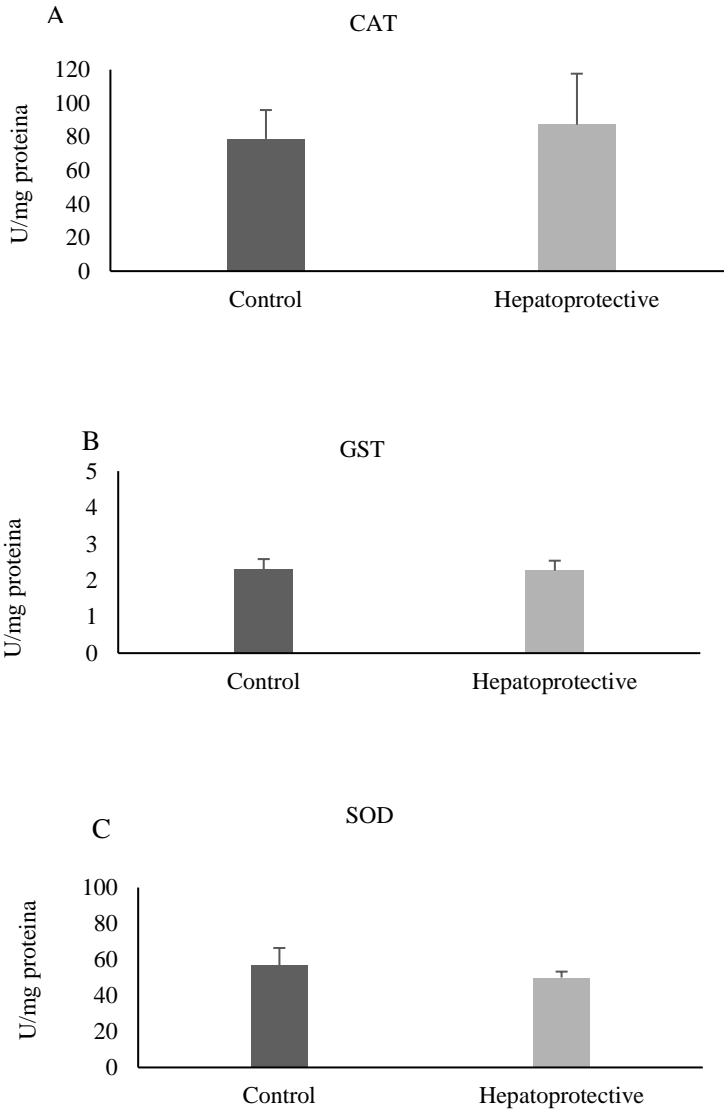


Tabela 1: Parâmetros hematológicos (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nylo após 54 dias de suplementação com o Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e controle. VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média, TPP = proteína plasmática total. (\*) indicam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

	Pré-desafio		Pós-desafio	
	Controle	Hepatoprotetor	Controle	Hepatoprotetor
Eritrócito ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	2,29 $\pm$ 0,40	2,55 $\pm$ 0,49	1,41 $\pm$ 0,43	1,83 $\pm$ 0,79
Trombócito ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	31,01 $\pm$ 17,64	64,60 $\pm$ 24,91*	10,16 $\pm$ 6,87	5,72 $\pm$ 6,15
Leucócito ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	62,70 $\pm$ 16,84	60,18 $\pm$ 13,29	27,94 $\pm$ 13,16	35,16 $\pm$ 16,98
Neutrófilo ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	5,81 $\pm$ 4,40	3,80 $\pm$ 4,17	18,33 $\pm$ 12,03	30,63 $\pm$ 18,26
Linfócito ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	99,34 $\pm$ 29,33	119,78 $\pm$ 21,81	27,54 $\pm$ 12,78	31,90 $\pm$ 18,10
Monócito ( $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ )	4,75 $\pm$ 4,79	3,92 $\pm$ 2,50	22,77 $\pm$ 8,96	28,95 $\pm$ 17,87
Hemoglobina (g $\text{dL}^{-1}$ )	12,97 $\pm$ 1,55	13,11 $\pm$ 1,78	7,74 $\pm$ 1,43	6,70 $\pm$ 0,83
Hematócrito (%)	33,67 $\pm$ 6,58	35,08 $\pm$ 6,44	25,00 $\pm$ 7,40	28,33 $\pm$ 7,95
VCM (fL)	148,79 $\pm$ 27,70	137,84 $\pm$ 8,74	199,04 $\pm$ 54,04	162,74 $\pm$ 20,68
CHCM (g $\text{dL}^{-1}$ )	38,93 $\pm$ 5,60	37,45 $\pm$ 2,30	31,70 $\pm$ 4,61	24,17 $\pm$ 4,03

Tabela 2: Parâmetros imunológicos séricos (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nylo após 54 dias de suplementação com Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e grupo controle.

	Pré-desafio		Pós-desafio	
	Controle	Hepatoprotetor	Controle	Hepatoprotetor
Proteína total do soro (mg $\text{mL}^{-1}$ )	35,57 $\pm$ 5,22	34,03 $\pm$ 0,34	34,38 $\pm$ 1,85	34,51 $\pm$ 3,29
Imunoglobulina (mg $\text{mL}^{-1}$ )	19,29 $\pm$ 5,66	16,92 $\pm$ 0,00	20,84 $\pm$ 2,02	20,48 $\pm$ 1,75
Título de aglutinação ( $\log_2 (x+1)$ )	3,58 $\pm$ 1,00	4,58 $\pm$ 0,00	4,25 $\pm$ 0,58	4,06 $\pm$ 1,29
Antimicrobiano	9,50 $\pm$ 0,50	9,67 $\pm$ 1,33	8,33 $\pm$ 2,08	8,33 $\pm$ 0,58

Tabela 3: Morfometria intestinal (média  $\pm$  desvio padrão) de tilápia-do-nylo após 54 dias de suplementação com Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e grupo controle.

<i>Morfologia</i>	Pré-desafio		Pós-desafio	
	<i>Controle</i>	<i>Hepatoprotetor</i>	<i>Controle</i>	<i>Hepatoprotetor</i>
<i>Vilos (média)</i>	25,17 $\pm$ 2,25	28,98 $\pm$ 2,88	20,67 $\pm$ 2,31	20,80 $\pm$ 3,63
<i>Altura de vilos (média)</i>	295,74 $\pm$ 51,35	344,70 $\pm$ 39,45	268,47 $\pm$ 112,42	334,10 $\pm$ 65,28
<i>Largura de vilos (média)</i>	128,25 $\pm$ 4,39	121,10 $\pm$ 3,92	97,22 $\pm$ 19,57	113,68 $\pm$ 11,85
<i>Célula caliciforme (média)</i>	11,54 $\pm$ 2,47	10,76 $\pm$ 1,86	18,57 $\pm$ 3,55	18,36 $\pm$ 10,86
<i>Lesão (infiltrado eosinofílico)</i>	1,00 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 0,29	1,33 $\pm$ 0,58	1,60 $\pm$ 0,55

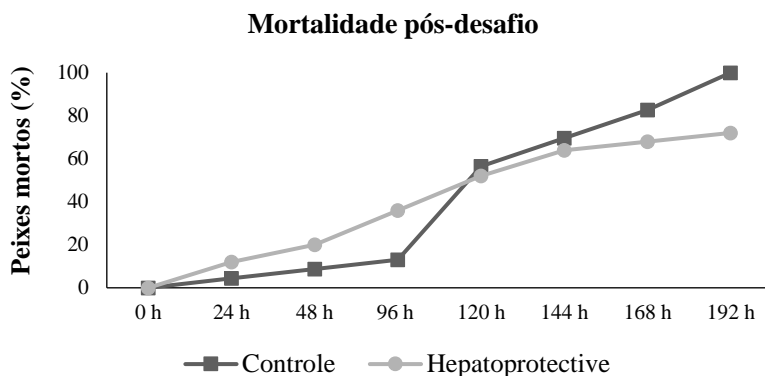
Tabela 4: Intensidade de alterações histológicas no fígado (média  $\pm$  desvio padrão) de tilápia-do-nylo após 54 dias de suplementação com Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e grupo controle. (\*) indicam diferença significativa entre os tratamentos (p <0,05).

<i>Lesão</i>	Pré-desafio		Pós-desafio	
	<i>Controle</i>	<i>Hepatoprotetor</i>	<i>Controle</i>	<i>Hepatoprotetor</i>
<i>Perda do aspecto cordonal</i>	2,00 $\pm$ 0,87	2,20 $\pm$ 1,01	2,33 $\pm$ 0,52	2,62 $\pm$ 0,52
<i>Perda da estrutura no pâncreas</i>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,13 $\pm$ 0,69	2,82 $\pm$ 0,34*
<i>Hepatócito balonoso</i>	0,41 $\pm$ 0,71	0,47 $\pm$ 0,74	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<i>Congestão de grandes vasos</i>	1,29 $\pm$ 0,59	1,20 $\pm$ 1,01	1,00 $\pm$ 0,89	1,00 $\pm$ 0,00
<i>Congestão de pâncreas</i>	1,24 $\pm$ 0,66	0,93 $\pm$ 0,88	1,00 $\pm$ 0,89	0,87 $\pm$ 0,35
<i>Congestão de sinusóide</i>	1,12 $\pm$ 0,70	0,73 $\pm$ 0,70	0,50 $\pm$ 0,55	0,63 $\pm$ 0,52
<i>Dilatação sinusoidal</i>	0,88 $\pm$ 0,70*	0,33 $\pm$ 0,62	0,33 $\pm$ 0,52	0,00 $\pm$ 0,00
<i>Infiltrado eosinofílico</i>	1,18 $\pm$ 0,64	1,27 $\pm$ 0,46	0,83 $\pm$ 0,41*	0,00 $\pm$ 0,00
<i>Infiltrado linfocitário</i>	1,00 $\pm$ 0,50	0,93 $\pm$ 0,70	0,50 $\pm$ 0,55*	0,00 $\pm$ 0,00
<i>Hipertrofia dos hepatócitos</i>	0,88 $\pm$ 0,78	0,93 $\pm$ 0,96	0,17 $\pm$ 0,41	0,00 $\pm$ 0,00
<i>Hipertrofia do núcleo dos hepatócitos</i>	0,06 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<i>Macroesteatose</i>	0,12 $\pm$ 0,33	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,82	0,13 $\pm$ 0,35
<i>Microesteatose</i>	0,65 $\pm$ 0,70	0,73 $\pm$ 0,70	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00
<i>Necrose</i>	0,82 $\pm$ 0,39	0,80 $\pm$ 0,41	1,17 $\pm$ 0,41	1,00 $\pm$ 0,00
<i>Núcleo com pinoise</i>	0,06 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
<i>Perda de núcleo dos hepatócitos</i>	0,06 $\pm$ 0,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

Tabela 5: Intensidade de alterações histológicas no Baço (média  $\pm$  desvio padrão) de tilápia-do-nilo após 54 dias de suplementação com Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e grupo controle.

<i>Lesão</i>	<i>Pré-desafio</i>		<i>Pos-desafio</i>	
	<i>Controle</i>	<i>Hepatoprotetor</i>	<i>Controle</i>	<i>Hepatoprotetor</i>
<i>Centro de melanomacrófagos</i>	0,88 $\pm$ 0,35	0,82 $\pm$ 0,75	2,75 $\pm$ 0,50	2,33 $\pm$ 0,82
<i>Melanomacrófago</i>	1,13 $\pm$ 0,35	1,36 $\pm$ 0,50	2,00 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 0,55
<i>Necrose</i>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,25 $\pm$ 0,50	0,83 $\pm$ 0,41
<i>Infiltrado eosinofílico</i>	0,88 $\pm$ 0,35	0,82 $\pm$ 0,40	1,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,55
<i>Infiltrado linfocitário</i>	0,00 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,30	0,25 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00
<i>Congestão de vasos</i>	2,88 $\pm$ 0,35	2,73 $\pm$ 0,90	2,25 $\pm$ 1,50	2,33 $\pm$ 0,52
<i>Esteatose</i>	0,25 $\pm$ 0,46	0,00 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 1,29	2,17 $\pm$ 0,41
<i>Aspecto de hemosiderina</i>	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,88 $\pm$ 0,64	1,18 $\pm$ 1,08

Figura 2: Gráfico da mortalidade acumulada da tilápia-do-nylo após infecção pelo patógeno bacteriano *S. agalactiae*.



### 2.3.6 Desempenho Zootécnico

Não foram evidenciadas alterações no comportamento alimentar dos animais tratados. Os peixes se alimentaram normalmente durante todo o experimento e consumiram facilmente a dieta que continha o hepatoprotetor, não sendo observada nenhuma desproporção do apetite entre os dois grupos. Em relação aos parâmetros zootécnicos após 54 dias de alimentação (Tabela 6), observou-se similaridade nos resultados obtidos, sem diferença significativa nos índices de crescimento entre o grupo hepatoprotetor e o grupo controle ( $p > 0,05$ ).

Tabela 6: Parâmetros de crescimento (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nylo após 54 dias de suplementação com o Hepatoprotetor Di-Heptarine S<sup>®</sup> (16% silimarina-fosfatídeo) e controle. TCE = taxa de crescimento específica, EF = eficiência alimentar.

Índices	Controle	Hepatoprotetor
TCE (%)	3,48 $\pm$ 0,04	3,55 $\pm$ 0,03
EF	0,70 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,03
Sobrevivência (%)	93,33 $\pm$ 6,66	97,78 $\pm$ 3,84
Peso médio final (g)	53,10 $\pm$ 1,00	54,82 $\pm$ 7,62
Comprimento médio (cm)	13,85 $\pm$ 0,22	13,46 $\pm$ 0,96
Biomassa final total (g)	646,53 $\pm$ 30,56	657,37 $\pm$ 42,25



## 2.4 DISCUSSÃO

A melhora do sistema imunológico dos animais é comprovada quando tratados a partir de alguns princípios ativos de plantas como os de manjerição, gengibre e cominho adicionados à dieta (Amal; Zamri-Saad, 2011; Yilmaz et al., 2013; Shakya, 2015; Brum et al., 2017). Em nosso estudo foi verificado que depois de 54 dias os peixes que receberam a ração contendo silimarina apresentaram na porção figurada do sangue maior quantidade de trombócitos, sugerindo uma possível melhora no sistema imune dos animais devido a ingestão de silimarina. A hematologia fornece informações acerca da saúde dos peixes e esse aumento do número de trombócitos no sangue indica que esses animais, possivelmente, obtiveram um incremento na função de defesa do organismo através da atividade fagocítica dos trombócitos (Tavares-Dias; Moraes, 2004). Isso corrobora com o estudo de Ahmadi et al. (2012), que testou o uso de silimarina sobre alguns parâmetros imunes de *oncorhynchus mykiss*, onde o número de leucócitos aumentou significativamente em peixes alimentados com 0,1 g silimarina kg<sup>-1</sup> ração no 15º dia e a contagem de trombócitos foi maior nos peixes alimentados com 0,8 e 0,1 g silimarina kg<sup>-1</sup> ração, em comparação com os peixes do grupo controle nos dias 15 e 30, respectivamente, causando um efeito imunoestimulante ou atividade imunoestimulatória nos animais.

Todos os animais deste estudo mantiveram-se ativos e se alimentaram normalmente para o padrão da espécie, idem ao observado por Banaee et al. (2011) quando testou a suplementação oral do extrato de *Silybum marianum* em *Oncorhynchus mykiss*. Em nosso estudo não foi verificada nenhuma alteração na performance zootécnica dos animais tratados em relação aos animais do grupo controle, diferentemente do estudo de Xiao et al. (2017), que relataram que a inclusão de 100 e 200 mg kg<sup>-1</sup> de silimarina na dieta promoveu uma melhora no crescimento de *Ctenopharyngodon idellus*. Estudos que investiguem melhor a influência da silimarina sobre o crescimento de peixes ainda são necessários, pois, são poucos os trabalhos publicados que verificam esta relação.

As análises hematológicas pós-infecção mostraram um aumento na quantidade de monócitos e neutrófilos circulantes no sangue dos peixes de ambos os grupos, contudo, sem diferença significativa entre eles. Diferentemente, Yamashita et. al. (2017), observaram igualdade na contagem de monócitos e redução na quantidade de neutrófilos no sangue dos peixes tratados, de  $9,28 \times 10^3 \mu\text{L}$  para  $1,95 \times 10^3 \mu\text{L}$  e no sangue dos peixes do grupo controle, de  $6,14 \times 10^3 \mu\text{L}$  para  $3,86 \times 10^3 \mu\text{L}$  estudando tilápias-do-nilo alimentadas com ração contendo *Lactobacillus*

*plantarum* e desafiadas com o patógeno *S. agalactiae*. Em nosso estudo, como o aumento na quantidade de monócitos e neutrófilos no sangue dos peixes ocorreu no período do desafio em ambos os grupos, acreditamos que essa alteração seja uma mudança do sistema imune, pois, estas células atuam diretamente na resposta inflamatória (Tavares-Dias; Moraes, 2004), nos dando um forte indicativo que o desafio experimental com o patógeno bacteriano causou uma resposta imediata no sistema de defesa dos peixes, caracterizando o processo inflamatório ao qual os animais foram induzidos.

A inclusão de silimarina à dieta dos peixes não modificou os parâmetros séricos plasmáticos, permanecendo iguais aos peixes do grupo controle, tanto antes, como depois da infecção. A administração oral de silimarina pode melhorar a síntese proteica no tecido do fígado dos peixes e uma elevação significativa dos níveis de proteína total no plasma reflete aumento da síntese proteica no tecido hepático (Banaee et al., 2011). Era esperado um incremento da proteína total nos peixes que receberam a alimentação suplementada com silimarina, entretanto, não ocorreu.

Já Banaee et al. (2011), obtiveram aumentos significativos nos níveis de proteína total plasmática de truta-arco-íris alimentados pelas dietas enriquecidas com 100 e 800 mg de silimarina / kg comparados aos grupos controle. Sendo que existe uma correspondência entre a taxa de síntese proteica no tecido hepático com as concentrações de proteínas totais no plasma (Banaee et al., 2011), a constância dos valores em ambos os momentos do presente estudo, provavelmente, reflete normalidade no processo de síntese proteica no tecido hepático, ainda que em situação de afecção causada pelo patógeno.

Histologicamente o presente estudo revelou que não ocorreram diferenças morfológicas no intestino dos peixes, antes e depois do desafio, indicando que a silimarina não causa nenhum dano aparente no órgão (Figura 3A, 3B, 3C, 3D). Haja visto que os animais tratados apresentaram semelhança no desempenho zootécnico com o grupo controle, pressupõe-se que a absorção de nutrientes pelo órgão, estava dentro dos padrões de normalidade. Barzaghi et al. (1990), em um estudo farmacológico com humanos desenvolveram esforços para aumentar a absorção intestinal da silibina (principal componente ativo da silimarina), incluíram a combinação da silibina com fosfatidilcolina (composto dB 1016), o que resulta em um aumento das concentrações de silibina biliar de 3 a 11%.

Surai (2015), afirma que em humanos a silimarina e seu principal componente, a silibina, fazem parte da mistura fitoquímica alimentícia responsável pela regulação das defesas antioxidantes no corpo. Por ser rica em flavonoides, pode não ser bem absorvida no intestino e por este

motivo suas concentrações nos tecidos e plasma podem ser baixas, entretanto, suficientes para ativação das enzimas antioxidantes, desencadeando um efeito de pré-condicionamento, fazendo com que o organismo se adapte a vários tipos de estresses. Talvez isso possa explicar a não ocorrência de alterações na morfologia intestinal dos peixes do presente estudo, uma vez que seriam necessárias maiores investigações sobre a relação da silimarina com a microbiota intestinal.

Os hepatotóxicantes (incluindo vírus, produtos fúngicos, metabolitos bacterianos, minerais, poluentes ambientais e agentes quimioterápicos), podem induzir diferentes distúrbios do órgão (Ha et al., 2005; Surai, 2015), toxinas estas, que causam lesões hepáticas, caracterizadas por diferentes graus de degeneração de hepatócitos e morte celular (Yeh et al., 2013). No presente estudo, nas análises do dia 54, a lesão mais severa observada foi a perda da manutenção do aspecto cordonal do órgão em ambos os grupos. Porém a dilatação dos sinusoides, que é uma manifestação de anormalidade na morfologia do tecido causada por fibrose (Kumar et al., 2015), foi mais severa no grupo controle (Figura 3E, 3F). A anemia crônica pode ser um fator que origina a dilatação e congestão dos sinusoides, pois, os hepatócitos centrolobulares são os últimos a receberem sangue oxigenado e com isso, tornam-se atrofícos. A congestão passiva dos vasos sanguíneos no fígado pode acontecer em todas as espécies animais, em função de algum distúrbio cardíaco. A congestão aguda do fígado, resulta num aumento de tamanho do órgão (Zachary et al., 2012). Nesse aspecto a silimarina melhorou o estado de integridade dos hepatócitos no fígado dos animais tratados e fez com que essa diferença fosse observada.

Por outro lado, as análises feitas após a infecção, evidenciaram que no fígado a lesão mais severa foi microesteatose em ambos os grupos, porém sem diferença significativa entre eles. A microesteatose foi caracterizada pela presença centenas de pequenas cavidades redondas e claras no tecido do órgão (Figura 4). Isso provavelmente pode ter ocorrido devido a falência das funções hepáticas, causada pelo quadro infeccioso, nas quais o fígado é responsável pela degradação metabólica de triglicérides, ocasionando o acúmulo de lipídios no tecido hepático, impedindo a liberação dos mesmos na forma de lipoproteínas (Zachary et al., 2012). Segundo Corchete (2008), a silimarina pode inibir a síntese de fosfolipídios em animais saudáveis, entretanto, quando submetidos a doses agudas de hepatotóxicantes a silimarina neutraliza a inibição de fosfolipídios causados, por exemplo, pelo etanol. Esses agentes estressores acarretam no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) no tecido do órgão e como consequência a peroxidação lipídica

de membranas celulares, tendo a silimarina capacidade de atenuar essas alterações (Surai, 2015).

Atualmente existem poucos trabalhos que relatam o uso da silimarina e seus benefícios sobre as funções hepáticas de algumas espécies de peixes, porém, os compostos bioativos de plantas e frutos já são bem conhecidos, como no estudo de Sharma et al., (2011), quando verificaram o uso de Naringina, um bioflavonoide isolado do *grapefruit*, na proporção de 100 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> restaurou as alterações patológicas, como aumento da inflamação e esteatose microvesicular e acumulação de lipídios em ratos injetados com estreptozotocina. O pâncreas dos animais que foram tratados com silimarina estavam com maior degeneração periacinar, que segundo Zachary et al. (2012), é um reflexo típico da ação de alguma toxina ou de um quadro de anemia aguda. Anteriormente à infecção não foi observada essa lesão nos órgãos, o que nos leva a crer que não há relação alguma da lesão com a ingestão da silimarina. Por esse motivo acreditamos que o quadro clínico causado pela infecção tenha provocado anemia aguda, pois, os peixes não se alimentaram nesse período de acometimento infeccioso.

Os infiltrados eosinofílicos e linfocitários são comuns em inflamações crônicas ou após uma resposta inflamatória aguda, e no fígado são descritos em doenças colestáticas primárias (Zachary et al., 2012), ou seja, quando há ocorrência de congestão do fluxo biliar. Tarantino et al. (2008), observaram que o infiltrado eosinofílico do tecido hepático foi significativamente mais frequente em pacientes que fizeram uso de medicamentos para hepatite C e encontrou associação significativa entre infiltrado eosinofílico, esteatose hepática e fibrose hepática. No presente estudo, após o desafio experimental, a ocorrência dos infiltrados eosinofílicos e linfocitários não foi observada nos tecidos dos fígados de tilápias-do-nilo que se alimentaram com a dieta contendo a silimarina dando forte indícios que esses animais desenvolveram uma modulação hepatoprotetora devido a inclusão do produto Di-Heptarine S® à dieta.

As lesões no baço não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, nem antes e nem depois da infecção. Entretanto, antes da infecção, a congestão dos grandes vasos foi a lesão com maior grau de severidade verificada, enquanto após a infecção os centros de melanomacrófagos foram mais presentes e severos. Outro aspecto verificado na histologia após a infecção, foi a provável presença de hemossiderina no baço. A hemossiderina ocorre em poucas quantidades no baço, entretanto a ocorrência de excessos no baço pode estar relacionada às doenças hemolíticas ou anemia hemolítica, que se forma a partir da destruição dos eritrócitos (Zachary et al., 2012). Wolke et al.

(1985), em uma avaliação preliminar do uso de agregados de macrófagos como indicadores da saúde de peixes, verificaram que animais de locais poluídos tiveram maior prevalência de hemossiderina no baço quando comparados com lugares menos poluídos. Igualmente, Fishelson (2006), ao verificar alterações citomorfológicas do timo, baço, rim e fígado em peixes cardinais (Apogonidae) como bioindicadores do estresse, encontrou no baço de animais capturados em locais poluídos, massas maiores de deposição de hemossiderina.

Conforme Sealy et al. (1980), os resultados da destruição tecidual incluem lipoproteínas e lipofuscina, que aumentam durante privação de alimento ou necrose tecidual e a hemossiderina, que é um produto da hemólise ou degradação de eritrócitos, é também elaborada em segundo plano em processos de subnutrição. Essas informações acerca da formação e da presença de hemossiderina em órgãos como o baço explicam a presença desses pigmentos no tecido dos órgãos dos peixes do presente estudo, uma vez que a hemossiderina só foi encontrado nas análises pós-infecção, onde, os animais estavam acometidos pela bactéria *S. agalactiae*, que causou um quadro característico de septicemia.

A atividade das enzimas CAT, SOD e GST, indicadoras do estresse oxidativo, foram mensuradas aos 54 dias de experimentação. Assim como nos vertebrados superiores, os peixes também desenvolveram um sistema que produz antioxidantes enzimáticos (CAT e SOD), que atuam na redução dos danos teciduais causados pelas espécies reativas de oxigênio (Surai, 2015), radicais livres derivados do oxigênio que são originados de neutrófilos e macrófagos contagiados por citocinas reguladores de inflamações e após o processo de fagocitose por leucócitos (Zachary et al., 2012), e enzimas de biotransformação de xenobióticos (GST), que são capazes de metabolizar esses contaminantes e contribuindo com a eliminação dos mesmos.

Nas análises realizadas em nosso estudo não foi verificada diferença estatística nas atividades enzimáticas de CAT, SOD e GST entre os peixes do grupo controle e os peixes do grupo tratado. Como essas enzimas são responsáveis pela prevenção da formação de radicais livres por meio da remoção de precursores de radicais livres ou pela inativação de catalisadores (Surai, 2015) é assertivo dizer que os peixes que consumiram a ração contendo silimarina não sofreram nenhum tipo de contaminação xenobiótica em função do produto Di-Heptarine S<sup>®</sup>. Ainda, segundo Surai (2015), a silimarina é como um antioxidante natural para humanos e animais, e como tal, é provável que esteja envolvida na regulação de muitos processos fisiológicos, no equilíbrio redox entre antioxidantes e pró oxidantes na dieta, trato gastrointestinal, plasma e

tecidos, refletindo diretamente na saúde dos peixes em nosso experimento.

Singh et al. (2014), quando verificaram *in vivo* o efeito do extrato hidroalcoólico de *S. marianum* sobre atividades antioxidantes em ratos albinos intoxicados por CCl<sub>4</sub>, afirmaram que *S. marianum* aumentou a atividade de SOD para 17,42±0,63; CAT para 45,24±1,84 e GPx para 21,96±0,39 U/mg de proteína, quando comparados ao grupo de ratos lesionados por CCl<sub>4</sub> (SOD 11,21; CAT 27,57 e GPx 17,14 U/mg de proteína). Entretanto, a silimarina quando comparada com o grupo controle (SOD 19,30; CAT 52,43 e GPx 25,34 U/mg de proteína) não apresentou diferença entre eles, assim como em nosso estudo, porém com valores diferentes. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de os peixes, diferentemente dos vertebrados terrestres, estarem constantemente expostos às EROs devido às condições do ambiente aquático (Chow, 1991), mesmo que as condições sejam controladas, o ambiente de experimentação pode apresentar variações pontuais na temperatura, oxigênio dissolvido, amônia pH, iluminação e além do estresse de cativeiro.

De fato, um estado moderado de estresse oxidativo induzido por múltiplos agentes estressores pode criar respostas adaptativas e melhorar a capacidade de adaptação aos desafios estressantes. A presença de antioxidantes naturais em organismos vivos é o que lhes permitem sobreviver em um ambiente rico em oxigênio (Surai, 2015).

Finalmente, após o desafio experimental, constatamos que 28% dos peixes tratados com Di-Heptarine S<sup>®</sup> sobreviveram ao confronto contra o patógeno bacteriano. Na avaliação histológica pós-infecção (Tabela 4) observamos que algumas lesões no fígado e baço não ocorreram ou ocorreram com menor intensidade, quando comparadas ao controle. Ainda que o sistema imune dos peixes teleósteos seja menos compreendido que os vertebrados superiores (Sunyer, 2013), essas análises podem nos direcionar para o entendimento destas taxas de sobrevivências ao final do desafio, uma vez que, em peixes de água doce o baço é um dos principais órgãos linfoides (Zapata et al., 2006), e o fígado é um órgão primário envolvido na biotransformação de substâncias tóxicas (Surai, 2015).

## 2.5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez os resultados dos efeitos da suplementação de 0,1% de silimarina em dietas para *Oreochromis niloticus*. A administração da silimarina como aditivo alimentar desenvolveu efeitos hepatoprotetores nos peixes, como menor dilatação sinusoidal, infiltrados eosinofílicos e linfocitários no fígado bem como aumento do número de trombócitos sanguíneos.

Figura 3: Imagens histológicas do intestino de tilápia-do-nilo. (A) Secção do intestino de tilápia grupo controle no 54º dia, onde é possível observar as células caliciformes e a presença de infiltrados eosinofílicos; (B) Secção do intestino de tilápia grupo hepatoprotetor no 54º dia, onde é possível observar as células caliciformes; (C) Secção do intestino de tilápia grupo controle após o desafio experimental, sendo possível observar grande quantidade de células caliciformes; (D) Secção do intestino de tilápia grupo hepatoprotetor após o desafio experimental, com células caliciformes em grande quantidade ; (E) Corte histológico do fígado do grupo controle no 54º dia, com a presença de lesões como esteatose, infiltrados eosinofílicos e necrose; (F) Corte histológico do fígado do grupo hepatoprotetor no 54º dia, é possível observar a integridade do tecido do órgão na imagem. Coloração H&E.

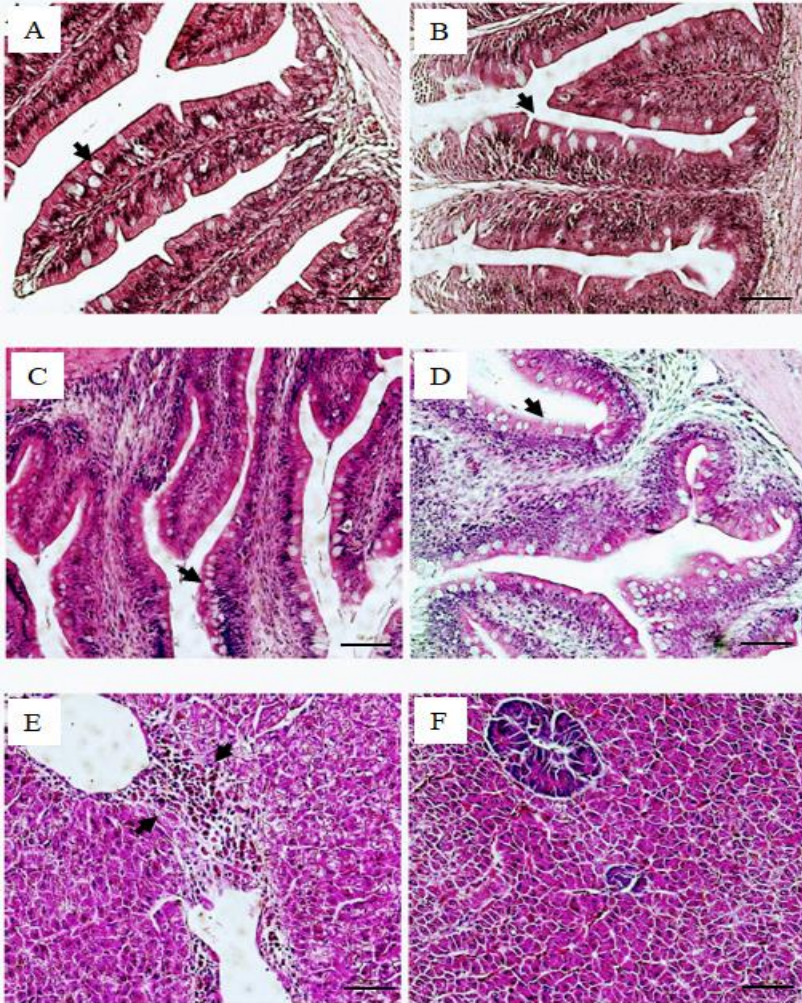
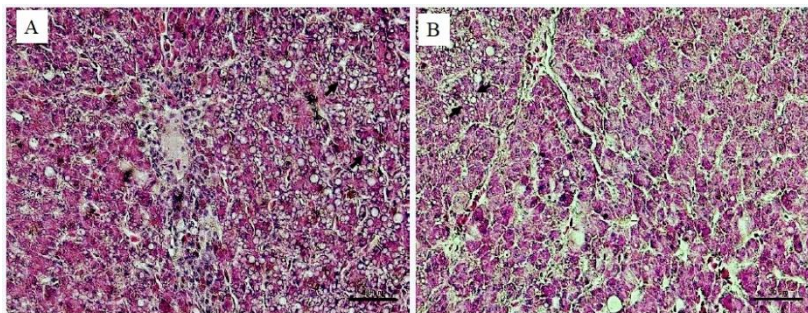




Figura 4: Histologia do tecido hepático de tilápias-do-nylo após o desafio experimental. Na imagem é possível observar microesteatose no tecido do fígado dos peixes de ambos os grupos. A controle e B hepatoprotetor.



## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por bolsa de pesquisa e apoio financeiro a J.L.P. Mouriño (CNPq 308292 / 2014-6) e M.L. Martins (CNPq 446072/2014-1, 305869/2014-0); Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina; Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI, UFSC) e Epagri – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina pela doação dos peixes.

## REFERÊNCIAS ARTIGO 1

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press.
- Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei, A. R., Mirvaghefi, A. R., & Ataiemehr, B. (2012). Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (actinopterygii: salmoniformes: salmonidae). *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, 42(2).
- Amal, M. N. A., & Zamri-Saad, M. (2011). Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika J Trop Agric Sci*, 34(2), 195-206.

Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., & Watanabe, T. (2000). Effects of dietary  $\beta$ -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 66(6), 1068-1075.

Azaza, M. S., Khiari, N., Dhraief, M. N., Aloui, N., Kraïem, M. M., & Elfeki, A. (2015). Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. *Aquaculture research*, 46(1), 14-27.

Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A. R., & Rafei, G. R. (2011). Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(4), 885-896.

Barzaghi, N., Crema, F., Gatti, G., Pifferi, G., & Perucca, E. (1990). Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 15(4), 333-338.

Brum, A., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., & Martins, M. L. (2017). Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468, 235-243.

Brum, A., Cardoso, L., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., & Martins, M. L. (2018). Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 490, 98-107.

Cao, L., Du, J., Ding, W., Jia, R., Liu, Y., Xu, P., ... & Yin, G. (2016). Hepatoprotective and antioxidant effects of dietary *Angelica sinensis* extract against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Research*, 47(6), 1852-1863.

Chow, C. K. (1991). Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(2), 215-232.

Collier, H. B. (1944). Standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, 50(6), 550.

Colturato, C. P., Constantin, R. P., Maeda, A. S., Constantin, R. P., Yamamoto, N. S., Bracht, A., ... & Constantin, J. (2012). Metabolic effects of silibinin in the rat liver. *Chemico-Biological Interactions*, 195(2), 119-132.

Corchete, P. (2008). *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin. In *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (pp. 123-148). Springer, Berlin, Heidelberg.

Facimoto, C. T., Chideroli, R. T., Gonçalves, D. D., do Carmo, A. O., Kalaphotakis, E., & de Pádua Pereira, U. (2017). Whole-Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* Strain S13, Isolated from a Fish Eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. *Genome Announcements*, 5(35), e00917-17.

Fishelson, L. (2006). Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (*Apogonidae, Teleostei*) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology*, 267(1), 57-69.

Flora, K., Hahn, M., Rosen, H., & Benner, K. (1998). Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 93(2), 139.

Fu, C., Cui, Y., Hung, S. S. O., & Zhu, Z. (1998). Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *Journal of Fish Biology*, 53(1), 115-129.

Ha, K. T., Yoon, S. J., Choi, D. Y., Kim, D. W., Kim, J. K., & Kim, C. H. (2005). Protective effect of *Lycium chinense* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 529-535.

Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., 2008. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Vet. Sci.* 13, 54-63.

Jacobs, B. P., Dennehy, C., Ramirez, G., Sapp, J., & Lawrence, V. A. (2002). Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 113(6), 506-515.

Karkanis, A., Bilalis, D., & Efthimiadou, A. (2011). Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 825-830.

Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183-6188.

Kumar, V., Abbas, A., & Aster, J. C. (2015). *Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças*. Elsevier Brasil.

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 180-183.

Owatari, M. S., Jesus, G. F. A., De Melo Filho M. E. S., Lapa, K. R., Martins, M. L., Mourinho, J. L. P. (2018). Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquacultural Engineering*. doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.001

Popma, T. J., & Lovshin, L. L. (1996). Worldwide prospects for commercial production of tilapia. *International Center for Aquaculture and Aquatic Environments*.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Eduem, Maringá (140 pp.)

Sanchez, R., Olivares, P., Carmona, E., Astuya, A., Herrera, H., & Parodi, J. (2016). Fish Nutrition Additives in SHK-1 Cells: protective effects of silymarin. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7(02), 55.

Sankaran, K.; Gurnani, S. Variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, v. 9, p. 162, 1972.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., & Triebkorn, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)*, 6(1), 75-86.

Sealy, R. C., Felix, C. C., Hyde, J. S., & Swartz, H. M. (1980). Structure and reactivity of melanins: influence of free radicals and metal ions. In *Free Radicals in Biology*, Volume 4 (pp. 209-259).

Shakya, S. R. (2015). Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) improves growth and enhances immunity in aquaculture. *International Journal of Chemical Studies*, 3(2), 83-87.

Sharma, A. K., Bharti, S., Ojha, S., Bhatia, J., Kumar, N., Ray, R., ... & Arya, D. S. (2011). Up-regulation of PPAR $\gamma$ , heat shock protein-27 and-72 by naringin attenuates insulin resistance,  $\beta$ -cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 106(11), 1713-1723.

Silva, B. C., Martins, M. L., Jatobá, A., Buglione Neto, C. C., Vieira, F. N., Pereira, G. V., ... & Mouriño, J. L. P. (2009). Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(11), 874-880.

Singh, S., Mehta, A., Ahirwal, L., Dubey, M. K., Mishra, A., Kumar, R., ... & Sedha, S. (2014). Combinational Effect of *Cajanus cajan*, *Silybum marianum* and *Andrographis paniculata* on in vivo Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Carbon Tetrachloride Intoxicated Albino Rats. *Annual Research & Review in Biology*, 4(4), 665.

Soto, E., Zayas, M., Tobar, J., Illanes, O., Yount, S., Francis, S., & Dennis, M. M. (2016). Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. *Journal of comparative pathology*, 155(4), 339-345.

Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature Immunology*, 14(4), 320.

Surai, P. F. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204-247.

Tarantino, G., Cabibi, D., Camma, C., Alessi, N., Donatelli, M., Petta, S., ... & Di Marco, V. (2008). Liver eosinophilic infiltrate is a significant finding in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(7), 523-530.

Tavares-Dias, M., & de Moraes, F. R. (2004). *Hematologia de Peixes Teleósteos*. Marcos Tavares-Dias.

Wintrobe, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, Frankfurt, v. 51, p. 32-49, 1934.

Wolke, R. E., Murchelano, R. A., Dickstein, C. D., & George, C. J. (1985). Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(1), 222-227.

Xiao, P., Ji, H., Ye, Y., Zhang, B., Chen, Y., Tian, J., ... & Du, Z. (2017). Dietary silymarin supplementation promotes growth performance and improves lipid metabolism and health status in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed diets with elevated lipid levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(1), 245-263.

Yamashita, M. M., Pereira, S. A., Cardoso, L., Araujo, A. P., Oda, C. E., Schmidt, É. C., ... & Mourinho, J. L. P. (2017). Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1235-1243.

Yeh, Y. H., Hsieh, Y. L., & Lee, Y. T. (2013). Effects of yam peel extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(30), 7387-7396.

Yılmaz, S., Ergün, S., & Soytaş, N. (2013). Dietary supplementation of cumin (*Cuminum cyminum*) preventing streptococcal disease during first-feeding of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of BioScience & Biotechnology*, 2(2).

Zachary, J. F., McGavin, D., & McGavin, M. D. (2012). *Bases da Patologia em Veterinária*. Elsevier Brasil.

Zaki, M. M., Eissa, A. E., & Saeid, S. (2011). Assessment of the immune status in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) experimentally challenged with toxogenic/septicemic bacteria during treatment trial with florfenicol and enrofloxacin. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 3, 21-36.

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., & Cortes, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 126-136.





### 3      **ARTIGO 2**

“Biopromoter by oral, intraperitoneal and immersion bath administration in Nile tilapia against *Streptococcus agalactiae*”).

Marco Shizuo Owatari<sup>a</sup>, Gabriel Fernandes Alves Jesus<sup>a</sup>, Maurício Laterça Martins<sup>a</sup>, José Luiz Pedreira Mouriño<sup>a</sup>

<sup>a</sup>AQUOS – Laboratório de Saúde dos Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (CCA, UFSC), Rodovia Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

\*Corresponding author. Tel: +55 48 996690814  
E-mail address: owatarimarco@hotmail.com



## RESUMO

Este estudo avaliou um composto biopromotor em tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus*, contra o patógeno bacteriano *Streptococcus agalactiae* sorotipo Ib por meio de diferentes vias de aplicação: oral, imersão e intraperitoneal, em comparação a um grupo controle basal e um grupo controle imunizado com vacina comercial. Foram utilizados 315 juvenis de tilápias-do-nilo com aproximadamente 45 dias de vida e peso médio inicial de  $0,72 \pm 0,04$  g. Os tratamentos foram distribuídos em triplicatas inteiramente ao acaso em 21 unidades experimentais em um sistema de recirculação de água durante 62 dias. Neste período, foram fracionadas diferentes doses do biopromotor para cada via de aplicação. Na via oral, foram adicionados 100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L do biopromotor para cada grama de ração ofertada; para o banho de imersão foram utilizados 500 mL e 1000 mL do biopromotor diluídos em 4,5 L e 4,0 L respectivamente; e para injeção intraperitoneal, 200  $\mu$ L por peixe. Após 54 dias de experimento foram coletadas amostras para análises hematológicas, imunológicas, histológicas e enzimáticas. No dia 55 os peixes foram desafiados com *S. agalactiae*, para que fosse verificada a eficácia do biopromotor e o possível aumento da resistência ao patógeno bacteriano, bem como alterações fisiológicas nos peixes. Ao final do experimento diferenças hematoimunológicas, histológicas e enzimáticas foram observadas entre os grupos. Nas análises realizadas antes da infecção os animais tratados com o biopromotor apresentaram melhorias no aspecto sanitário, verificadas através do incremento no número de trombócitos e neutrófilos em comparação aos peixes do grupo controle. Após a infecção experimental os peixes dos grupos tratados apresentaram aumento na quantificação de hematócrito, eritrócito, trombócito, leucócito e neutrófilo em relação aos peixes do grupo controle. A histologia revelou que os peixes tratados apresentaram maior integridade nos órgãos após o desafio com o patógeno, indicando que esses animais estavam mais preparados para o confronto com a bactéria. A atividade da catalase foi aumentada nos peixes dos grupos tratados, onde o tratamento IntraVet foi igual ao controle positivo IntraCom. Todos os resultados desse estudo indicam que as tilápias que receberam o biopromotor desenvolveram melhorias nos mecanismos do sistema imune, caracterizando um quadro imunomodulatório nos animais.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, vacina, bacteriose, sanidade.

## ABSTRACT

This study evaluated a biopromoter in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* against the bacterial pathogen *Streptococcus agalactiae* serotype Ib by different routes of application: oral, immersion and intraperitoneal, as compared to a basal control group and a control group immunized with commercial vaccine. A total of 315 juveniles of Nile tilapia with approximately 45 days of life and initial mean weight of  $0.72 \pm 0.04$  g were used. The treatments were randomly distributed in triplicates in 21 experimental units in a water recirculation system for 62 days. In this period, different doses of the biopromoter were fractionated for each route of application. In the oral route, 100  $\mu$ L and 200  $\mu$ L of the biopromoter were added to each gram of feed offered; for the immersion bath 500 mL and 1000 mL of the biopromoter diluted in 4.5 L and 4.0 L respectively were used; and for intraperitoneal injection, 200  $\mu$ L per fish. After 54 days of the experiment, samples were collected for hematological, immunological, histological and enzymatic analyzes. At day 55 the fish were challenged with *S. agalactiae*, to verify the efficacy of the biopromoter and the possible increase in bacterial pathogen resistance, as well as physiological changes in the fish. At the end of the experiment, hematoimmunological, histological and enzymatic differences were observed between groups. In the analyzes performed before the infection the animals treated with the biopromoter presented improvements in the sanitary aspect, verified by the increase in the number of thrombocytes and neutrophils in comparison to the fish of the control group. After the experimental infection the fish in the treated groups showed an increase in the quantification of hematocrit, erythrocyte, thrombocyte, leukocyte and neutrophil in relation to the fish of the control group. Histology revealed that the treated fish presented greater integrity in the organs after the challenge with the pathogen, indicating that these animals were more prepared for the confrontation with the bacterium. Catalase activity was increased in fish from the treated groups, where the IntraVet treatment was equal to the IntraCom positive control. All the results of this study indicate that the tilapias that received the biopromoter developed improvements in the mechanisms of the immune system, characterizing an immunomodulatory framework in the animals.

Key words: *Oreochromis niloticus*, vaccine, bacteriosis, sanitty.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As doenças de origem bacteriana são as principais causas de perdas em criações de tilápias, onde a espécie *Streptococcus agalactiae* apresenta o maior percentual de diagnósticos positivos (82%) entre as bacterioses (MSD Animal Health, 2012). *S. agalactiae* é uma bactéria gram-positiva com predileção para infectar peixes cultivados em águas com temperaturas iguais ou superiores a 31 °C, causando septicemia, meningoencefalite, hemorragias, opacidade na córnea e escoliose. No Brasil a tilapicultura é predominante e surtos de *S. agalactiae* são os grandes causadores de doenças (Pretto-Giordano et al., 2010; Amal; Zamri-Saad, 2011; Pereira et al., 2013; Yi et al., 2014).

A preparação biológica é uma estratégia dentro da aquicultura e têm como objetivo proporcionar uma resposta imunitária forte a um antígeno administrado, que seja capaz de produzir proteção contra o patógeno a longo prazo (Amal; Zamri-Saad, 2011). No mercado mundial há vacinas disponíveis em 40 países para mais de 17 espécies de peixes, sendo 22 para prevenção de bacterioses. Apesar deste panorama mundial, a vacinação não é uma prática comum em países como a China, por exemplo, que é um grande produtor aquícola (Brudeseth et al., 2013). Os desafios do desenvolvimento de vacinas para peixes esta enfocado em somente patogenos especificos, no entanto, devido aos patógenos emergentes, é necessário que a imunomodulação ocorra de forma a abranger uma maior gama de patógenos.

A extensão da resposta imunitária dos peixes está relacionada às condições fisiológicas do animal, com os métodos de preparo dos biopromotores, com as doses e com as vias de aplicações dos mesmos. Geralmente os peixes podem ser imunizados por injeções intraperitoneais, via oral ou banhos de imersão; tendo cada um destes métodos as suas vantagens e desvantagens em relação ao nível de proteção, efeitos secundários, praticidade e rentabilidade (Gudding et al., 1999; Li et al., 2015).

O uso de biopromotores em pisciculturas requer informações sobre fatores ambientais (componentes do hospedeiro-patógeno-meio ambiente) e o estado fisiológico do peixe (medidas de hematócrito, leucócitos, níveis de atividade de neutrófilos e fagocíticos), pois, podem determinar a capacidade do peixe para resistir às doenças. Além disso, os biopromotoeres podem induzir atividades elevadas nos mecanismos de defesa inespecíficos, como aumento da atividade oxidativa de neutrófilos, aumento de atividade de células fagocíticas ou potencialização de células citotóxicas. Nos casos em que os surtos de doenças são cíclicos e

previsíveis, os prejuízos podem ser reduzidos ao elevar os mecanismos de defesa inespecíficos dos animais, e os biopromotores podem ser usados em antecipação desses eventos para prevenção de doenças. Sendo assim, os biopromotores possuem um enorme potencial de uso em fazendas aquícolas para reduzir os danos causados por doenças infecciosas (Anderson, 1992; Magnadottir, 2006).

Devido à grande diversidade de peixes que estão sendo cultivados, diferenças consideráveis podem ser encontradas entre alguns elementos importantes do sistema imunológico. Embora, essas diferenças possam ter impacto em estratégias específicas, como o desenvolvimento de vacinas, a resposta imune global geralmente é similar entre as espécies de peixes (Pohlenz; Gatlin, 2014). Apesar de, a maioria das vacinas bacterianas tenham se demonstrado eficientes, os esforços de pesquisa ainda são necessários para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de vacinas e/ou bioprodutos similares que possam ser utilizados na aquicultura e que sejam verdadeiramente eficazes para os peixes teleósteos (Caipang et al., 2014), e para as diferentes enfermidades (Embregts; Forlenza, 2016).

Dessa forma, pesquisas que visem o desenvolvimento de novas tecnologias, produtos e estratégias que possibilitem um incremento na resistência da tilápia-do-nylo se tornam necessárias e indispensáveis, permitindo assim, o crescimento sustentável da piscicultura mundial. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração oral, intraperitoneal e banho de imersão de um biopromotor e verificar possíveis melhorias sobre os parâmetros hematológicos, imunológicos, histológicos e enzimáticos de tilápias-do-nylo, além de realizar um enfrentamento do patógeno *Streptococcus agalactiae* ao final do período experimental, bem como avaliar o desempenho zootécnico dos animais.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Delineamento experimental

O experimento foi iniciado com alevinos de tilápias-do-nylo com peso inicial de  $0,72 \pm 0,04$  g e conduzido durante 62 dias. Um total de 315 juvenis foram distribuídos em 21 unidades experimentais de 80 L, totalizando 15 animais por tanque. Os peixes foram aclimatados durante dois dias e distribuídos casualmente em 7 tratamentos, todos em triplicatas. As unidades experimentais estavam dispostas em um sistema de recirculação de água com filtro físico e biológico conforme Owatari et al. (2018), aquecimento central de água, além de tratamento por radiação

ultravioleta (UV) e com fotoperíodo de 12 h. Foram monitorados o oxigênio dissolvido, temperatura, pH, amônia total e tóxica, nitrito e alcalinidade. Para realização do experimento, foi utilizada ração comercial da marca Nicoluzzi® (40 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta, 125 g kg<sup>-1</sup> de umidade, 50 g kg<sup>-1</sup> de extrato etéreo e 35 g Kg<sup>-1</sup> de fibra bruta) capaz de atender as exigências nutricionais da tilápia-do-nylo. Os peixes foram alimentados a uma taxa inicial de 16% da biomassa (ração em pó) e terminando em 6% da biomassa (ração 2,6 mm). A ração foi dividida em 5 porções e fornecida ao longo do dia em intervalos de 2 h.

O Gamaxine®, elaborado a partir de produtos da fermentação de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) inativado 50 mL 0,1 L<sup>-1</sup> e parede de levedura 0,5g 0,1 L<sup>-1</sup>, foi administrado de três formas: via intraperitoneal em um momento com dose única; via banho de imersão em dois momentos e via oral incorporado à ração também em dois momentos. Além disso, foram estabelecidos um grupo controle positivo, o qual foi imunizado com a vacina comercial AQUAVAC® e um grupo controle basal, o qual recebeu somente a ração comercial. Aos 54 dias de experimentação, amostras foram coletadas para análises hematológicas, imunológicas, histológicas e enzimáticas. Após, foi realizado um desafio experimental de resistência contra a bactéria *S. agalactiae* e avaliadas as alterações na estrutura dos órgãos internos e na composição sanguínea com análises histológicas, hematológicas e imunológicas, além da resistência dos animais infectados com a bactéria patogênica. O procedimento experimental com os animais foi aprovado pela comissão de uso de animais e protocolado sob o CEUA nº 9594280417.

### 3.2.2 Vias de aplicação do biopromotor experimental

#### 3.2.2.1 Intraperitoneal

A aplicação do biopromotor via intraperitoneal foi realizada no 41º dia do experimento, 14 dias antes do desafio de infecção, onde os peixes foram confrontados contra o patógeno bacteriano *S. agalactiae*. Uma vacina comercial, AQUAVAC®, foi aplicada no grupo controle positivo. A dose aplicada do biopromotor experimental (IntraVet) foi de 200 µL por peixe e da vacina comercial (IntraCom) 50 µL por peixe como recomendado pelos fabricantes. No dia da aplicação das doses intraperitoneais, um peixe de cada tanque dos tratamentos IntraVet e IntraCom foi retirado dos grupos e submetido aos mesmos procedimentos de vacinação, porém com uma dose de solução fosfato-salina (PBS -

*phosphate buffered saline*) e mantido em outro tanque separado a título de controle pós-vacinação.

### 3.2.2.2 Imersão

Na via de imersão os banhos ocorreram em dois momentos distintos do experimento. O primeiro banho foi realizado no início experimento (dia zero) e o segundo banho aos 45 dias de experimentação. Também foram aplicadas duas concentrações diferentes do biopromotor nos banhos. Uma dose de 1000 mL do produto em 4,0 L de água (Imersão 1) e a outra dose de 500 mL do produto em 4,5 L de água (Imersão 2), nas quais os peixes permaneceram por 20 minutos.

### 3.2.2.3 Oral

Na via oral as doses foram aspergidas diretamente na ração. Os peixes receberam a ração contendo o biopromotor por dois dias consecutivos, em dois momentos diferentes no decorrer do período. A primeira alimentação contendo o aditivo biopromotor foi ofertada nos dias 30 e 31 e a segunda nos dias 45 e 46 do experimento. A inclusão do produto à ração foi realizada 30 minutos antes do manejo alimentar. Foram utilizadas duas dosagens distintas. Uma dose definida em 100 µL (Alim 1) do produto por grama de ração e outra em 200 µL (Alim 2) do produto por grama de ração (Tabela 1).

Tabela 1: Tratamentos definidos para as doses e vias de aplicação do biopromotor. Imersão 1 (dose de 1000 mL), Imersão 2 (dose de 500 mL); IntraVet (intraperitoneal vetanco); IntraCom (intraperitoneal comercial); Alim 1 (oral dose de 100 µL) e Alim 2 (dose de 200 µL) e Controle

<b>Tratamentos</b>	<b>Desafio</b>	<b>Vias</b>	<b>Réplicas</b>
Imersão 1	Sim	2 banhos (dia 0 e dia 45)	3
Imersão 2	Sim	2 banhos (dia 0 e dia 45)	3
IntraVet	Sim	Injeção <i>Gamaxine</i> <sup>®</sup>	3
IntraCom	Sim	Injeção <i>AQUAVAC</i> <sup>®</sup>	3
Alim 1	Sim	Oral (dias 30 e 31/45 e 46)	3
Alim 2	Sim	Oral (dias 30 e 31/45 e 46)	3
Controle	Sim		3



### 3.2.3 Coleta de material

Duas coletas de material biológico foram realizadas. A primeira foi efetuada no 54º dia após o início do ensaio. Para verificar o estado de saúde dos animais antes da infecção, foram coletadas amostras para análises hematológicas, imunológicas, histológicas e enzimáticas. No 55º dia os peixes foram desafiados com *S. agalactiae*, conforme descritos na seção 6.2.4. A segunda coleta ocorreu entre os dias 56 e 62 do ensaio (50% de mortalidade do lote ou até a estabilização da curva de mortalidade). Após o desafio foram coletadas amostras para análises hematológicas, imunológicas e histológica. Os peixes foram submetidos ao procedimento anestésico profundo com eugenol e a retirada do material para análise foi feita de maneira asséptica para que não ocorresse contaminação cruzada entre os tratamentos.

### 3.2.4 Desafio experimental

No 54º dia do experimento os peixes atingiram o peso aproximado de 50 g, peso no qual os animais estão mais suscetíveis às doenças, conforme Mian et al. (2009). A temperatura da água foi elevada até 31 °C e no 55º dia os peixes foram desafiados com a cepa de *S. agalactiae* sorotipo Ib, cepa isolada por Facimoto et al. (2017), de surtos de mortalidade em tilapiculturas no norte do estado do Paraná.

Anteriormente, foi realizada a dose letal 50 (DL<sub>50-96H</sub>) para verificar a concentração de bactéria ideal para realizar o desafio. Para isso, 40 animais foram distribuídos em 8 unidades experimentais de 30 L, com aeração e temperatura controlada, totalizando cinco animais por unidade experimental. A DL<sub>50</sub> foi realizada em duplicata e as doses testadas foram: 1×10<sup>5</sup>; 1×10<sup>6</sup>; 1×10<sup>7</sup>; 1×10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. O *S. agalactiae* foi cultivado em meio de cultura BHI (Himedia, Índia) a 32 ° C durante 24 h. A cultura foi centrifugada a 1.500 G 10 min-1 e o sobrenadante descartado. O precipitado bacteriano foi ressuspenso em PBS. Após a verificação da concentração das bactérias no inóculo ajustado pela curva de crescimento (concentração bacteriana x absorbância) previamente realizada, a diluição foi realizada para atingir a concentração ideal para o desafio. A infecção experimental foi realizada via injeção intraperitoneal de 100 µL de *S. agalactiae* por peixe, na concentração de 1×10<sup>7</sup>. O controle negativo foi composto, em triplicata, por animais injetados com solução de PBS e tratados de forma semelhante.

No 55º dia do experimento os peixes de todos os grupos foram desafiados com o patógeno *S. agalactiae*. Foram observados os sinais clínicos e coletadas as amostras quando verificada a mortalidade de 50% do lote e/ou estabilização da curva de mortalidade. Fragmentos de fígado, rim e cérebro foram coletados assepticamente para reisolamento da bactéria (postulado de Koch). As amostras foram colocadas em tubos contendo meio líquido BHI para crescimento. Posteriormente, o conteúdo foi plaqueado em meio ágar triptona de soja (HiMedia) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e as placas foram incubadas a 32 °C por 12 h para visualização e caracterização das colônias de *S. agalactiae*. O inóculo utilizado no desafio experimental continha somente a cepa bacteriana, sem a presença de metabólitos produzidas durante seu preparo.

### 3.2.5 Análises

#### 3.2.5.1 Análise hematológica e imunológica

O sangue foi coletado por punção do vaso caudal com seringas de insulina contendo anticoagulante para contagem de eritrócitos total e diferencial da série branca. O sangue foi utilizado para a confecção de extensões sanguíneas e coradas com MayGrunwald/Giemsa/Wright - MGGW (Ranzani-Paiva et al., 2013), para a contagem diferencial de leucócitos, bem como contagem total de leucócitos (WBC) e trombócitos pelo método indireto, segundo Ishikawa et al. (2008). Uma alíquota foi usada para a determinação do hematócrito (Ranzani-Paiva et al., 2013) e o restante para quantificação do número total de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer após diluição 1:200 em solução Dacie.

A concentração de hemoglobina foi analisada pelo método da cianometahemoglobina (Collier, 1944). Equações hematimétricas foram utilizadas para determinação do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Wintrobe, 1934).

Para análises imunológicas foi realizado um “pool” do sangue de três peixes, sem anticoagulante, por unidade experimental. O sangue após coagulado foi centrifugado a 1400 g durante 10 min para retirada do soro e armazenamento a -20 °C para análises imunológicas de atividade de lisozima (Sankaran; Gurnani, 1972), proteína total (LabTest®), concentração de imunoglobulina total (Amar, 2000) e título da atividade aglutinante do soro (Silva et al., 2009).

Para verificação da atividade antimicrobiana do soro, um inóculo da *S. agalactiae* foi crescido em BHI a 32 °C por 24 h, preparados na concentração de 0,5 na escala de *Macfarland* e diluído em meio de cultura pobre (PB, do *Poor Broth*) 100.000 vezes. Posteriormente foi realizada diluição seriada do soro em meio PB no fator 1:2 até o 12° poço. Para controle positivo e branco, solução salina foi diluída em PB, da mesma forma que o soro. Finalmente, 20 µL da bactéria foi adicionado em cada poço da amostra diluída do soro e do controle positivo. A microplaca contendo *S. agalactiae* foi incubada a 32 °C por 24 h. O crescimento dos micro-organismos foi determinado visualmente pela observação da formação de um botão no fundo do poço. A atividade antimicrobiana do soro foi recíproca à última diluição que apresentou atividade bactericida.

### 3.2.5.2 Análise histológica

Para avaliação histológica foram coletadas amostras do fígado, intestino, baço e brânquias de quatro peixes no 54° dia de experimentação e de três peixes após o desafio com o patógeno bacteriano. As amostras foram fixadas em formalina 10%. Posteriormente as amostras foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de álcool etílico, clarificados em xilol e incluídos em parafina a 60 °C para cortes de 4 µm de espessura (micrótomo PAT- 54 MR10) e colorados com hematoxilina-Eosina (H&E). Em seguida as lâminas foram montadas em meio *Entellan*<sup>®</sup> e analisadas em microscópio de contraste de interferência de fase (DIC) *Axio Imager A.2* com o software *Zen Pro* (*Zeiss, Gottingen, Alemanha*).

Para todos os órgãos, atribuiu-se valores às alterações histológicas, conforme o grau de intensidade: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25% da área do órgão), 2 (alteração moderada, 25% a 50% da área do órgão) e 3 (alteração severa, mais de 50% da área do órgão), de acordo com o método descrito por Schwaiger et al. (1997), ligeiramente modificado por Brum et al. (2018).

No fígado, considerou-se como alterações histopatológicas a perda do aspecto cordonal, perda da estrutura no pâncreas, hepatócito balonoso, congestão nos grandes vasos, congestão nos sinusoides e no pâncreas, dilatação sinusoidal, hipertrofia dos hepatócitos, infiltrado eosinofílico, infiltrado linfocitário, hipertrofia do núcleo dos hepatócitos, macroesteatose, microesteatose, necrose, núcleos com picnose e perda do núcleo dos hepatócitos. Na morfologia intestinal, foram medidos a altura e largura de vilos, bem como o número dos vilos e células caliciformes, infiltrado eosinofílico e infiltrado linfocitário. No baço, considerou-se os centros de melanomacrófagos, melanomacrófagos, congestão de vasos,

infiltrado eosinofílico, infiltrado linfocitário, esteatose e aspecto de hemossiderina.

No tecido branquial foram consideradas as seguintes alterações: aneurisma, congestão e dilatação do veio central, congestão na base da lamela secundária, descolamento do epitélio da lamela secundária, dilatação do seio venoso, edema justa lamelar, fusão de lamelas secundárias, hiperplasia interlamelar, hiperplasia da lamela secundária, hipertrofia das células caliciformes, infiltrado eosinofílico, telangiectasia e epitéliocistis.

### 3.2.5.3 Análise enzimática

Para verificação da atividade enzimática, foram realizadas análises de quantificação de algumas enzimas de estresse oxidativo, como superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e glutationa S-transferase (GST) no fígado de animais tratados e animais do grupo controle. Para isto, foi realizado um *pool* de partes do tecido hepático de quatro animais, totalizando 100 mg de tecido por amostra. O tecido foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mM, KCl 0,15 M, PMSF 100  $\mu$ M, pH 7,4, na proporção de 1 g de tecido para 5 mL de tampão (1:5). O homogeneizado foi centrifugado a 9000 $\times$ g por 30 minutos a 4 °C. As análises enzimáticas foram realizadas a partir da fração sobrenadante.

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada conforme Aebi (1984), a qual mede a velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima através do decréscimo de absorbância a 240 nm ( $\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) a 25 °C. A determinação da atividade da glutationa S-transferase (GST) foi realizada segundo Keen et al. (1976), fundamentado na velocidade de formação do conjugado CDNB-GSH (1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno), realizando uma leitura em espectrofotômetro a 340 nm, durante 2 minutos. A atividade superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com a metodologia descrita por McCord e Fridovich (1969).

### 3.2.5.4 Análise zootécnica

Ao final do experimento foram avaliados os parâmetros de crescimento específico (TCE), eficiência alimentar (EA) e sobrevivência, calculados de acordo com Fu et al. (1998).

$$TCE (\% \cdot dia^{-1}) = \left[ \frac{(\text{Log}(\text{peso final}) - \text{Log}(\text{peso inicial}))}{\text{dias de cultivo}} \right] \times 100$$

$$EA = \left[ \frac{(\text{Biomassa final} - \text{Biomassa inicial})}{\text{Ração ofertada}} \right]$$

$$\text{Sobrevivência} = \left[ \frac{(\text{População inicial} - \text{População final})}{\text{População inicial}} \right] \times 100$$

### 3.2.5.5 Estatística

O experimento foi projetado com um delineamento inteiramente casualizado para testar diferenças significativas nas médias dos tratamentos. Os dados foram expressos como média e desvio padrão. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram consideradas significativas a  $P < 0,05$  pela análise de variância unidirecional (ANOVA) utilizando o software *Statistica*<sup>®</sup>. Ocorrendo diferenças significativas nos meios, aplicou-se o teste de *Tukey*. Para todos os testes estatísticos, fixou-se nível de significância de 5%. Transformações de dados foram aplicadas quando necessário. Todos os resultados obtidos antes do desafio foram analisados em separado dos dados obtidos após o desafio.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Parâmetros de qualidade da água

As condições de experimentação mantiveram-se dentro dos padrões esperados para a manutenção da espécie em cativeiro (Popma et al., 1996). As variáveis de qualidade da água permaneceram estáveis e apresentaram as seguintes médias e desvios durante o ensaio: temperatura  $28,68 \pm 0,84$  °C; pH  $6,86 \pm 0,31$ ; amônia total  $0,55 \pm 0,91$  mg L<sup>-1</sup>; nitrito  $0,17 \pm 0,12$  mg L<sup>-1</sup>; alcalinidade  $26,88 \pm 15,12$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> e oxigênio dissolvido  $6,60 \pm 0,45$  mg L<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Parâmetros hematológicos e imunológicos

Após 54 dias de experimentação o volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o

hematócrito apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. O VCM foi mais elevado no tratamento imersão 1, diferindo de Imersão 2, IntraCom, Alim 2 e controle, porém semelhante ao IntraVet e Alim 2. A CHCM foi maior em IntraVet quando comparada a Imersão 1, porém igual aos demais tratamentos. O hematócrito em Alim 1 foi diferente do controle, porém semelhante aos demais grupos. Os elementos figurados do sangue eritrócitos, linfócitos e monócitos não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Porém, o número de trombócitos foi maior em Imersão 1 e IntraCom quando comparados a Imersão 2 e Alim 1. Já os leucócitos foram aumentados em IntraCom quando comparados com Imersão 1. A neutropenia ocorreu em Alim 1 quando comparado aos demais tratamentos, enquanto neutrofilia ocorreu em Imersão 1. Os parâmetros imunológicos proteína total do soro, imunoglobulina total, aglutinação e antimicrobiano não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Tabela 2).

Diferentemente, as análises realizadas após a infecção experimental, mostraram diferenças significativas na hemoglobina entre os tratamentos. A hemoglobina foi mais elevada em IntraCom quando comparada a Imersão 2. Já o VCM e CHCM não apresentaram diferenças entre os tratamentos. O hematócrito foi maior em IntraCom quando comparado a Imersão 2, IntraVet e controle, mas similar aos demais tratamentos. As contagens de neutrófilos não mostraram diferenças entre os tratamentos. Já eritrócitos, trombócitos, leucócitos, linfócitos e monócitos diferiram entre os tratamentos. O eritrócito foi menor no controle e IntraVet, porém, maior em IntraCom. Igualmente, trombócito e leucócito foram mais elevados em IntraCom. A contagem de linfócitos no grupo IntraCom diferiu dos demais grupos. Monócitos foi maior no controle e Alim 1, enquanto em IntraCom foi menor. Novamente os parâmetros imunológicos proteína total do soro, imunoglobulina total, aglutinação e antimicrobiano não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 3).

### 3.3.3 Parâmetros histológicos

No 54º dia as análises mostraram alterações histológicas no fígado dos peixes, com diferenças significativas entre os tratamentos. Os peixes do tratamento Alim 2 apresentaram menor variedades de lesões no fígado. Para a lesão hepatócito balonoso o tratamento IntraVet apresentou maior grau de intensidade da lesão quando comparado aos demais grupos e no grupo Imersão 2 não foi observada lesão. Na congestão dos sinusoides a intensidade das lesões foi maior em Imersão 1 (Figura 4F), Imersão 2 e

IntraVet, enquanto em Alim 1 e Alim 2 foi menor. A dilatação dos sinusoides ocorreu com maior intensidade em Imersão 2, IntraVet e IntraCom (Figura 4E), sendo menos intensa em Alim 1 e Alim 2. A hipertrofia dos hepatócitos ocorreu com maior intensidade no tratamento IntraVet e IntraCom, sendo menos intensa em Imersão 1 e igual nos demais grupos. A microesteatose foi mais intensa em IntraVet e Alim 2 (Figura 3A) e igual entre IntraCom, Alim 1 e controle (Figura 3B). O núcleo com picnose foi observado com maior intensidade no grupo Imersão 1 e IntraCom. As demais lesões ocorreram sem diferença significativa entre os grupos.

No baço, aos 54 dias do experimento, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nas lesões esteatose (Figura 3D) e aspecto de hemosiderina. A esteatose na Imersão 1 foi mais severa quando comparada ao grupo controle e igual entre os demais grupos. O Aspecto de Hemosiderina em Alim 1 e Alim 2 (Figura 3C) foi mais intenso em comparação a Imersão 2 e IntraVet. Os infiltrados linfocitários só ocorreram no grupo Alim 2. Nas demais lesões observadas no baço não ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

As brânquias dos peixes no 54º dia estavam com congestão do veio central mais intensa nos tratamentos Imersão 2 e IntraCom, diferentes do controle (Figura 4D) e Imersão 1 que foram menores. Nos grupos Alim 1 (Figura 4C) e Alim 2 não foi observado tal lesão. A dilatação do veio central foi mais intensa em IntraCom e Imersão 2 em comparação ao controle e Imersão 1. Igualmente, em Alim 1 e Alim 2, não se observou a lesão. Descolamento do epitélio da lamela secundária só foi observado em IntraCom. Edema justalamelar foi mais severo em IntraCom e menos severo em IntraVet, porém igual entre os demais grupos. Os peixes do tratamento IntraVet apresentaram menor variedades de lesões. As demais lesões nas brânquias não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos.

Na morfometria intestinal dos peixes (Figura 4A e 4B) não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto ao número, comprimento e largura de vilos, quantidade de células calciformes e infiltrados eosinofílicos (Tabela 4).

Nas análises histológicas pós-infecção mostraram que no fígado os peixes de Imersão 1 e IntraVet apresentaram menor variedades de lesões. Entretanto a perda da manutenção do aspecto cordonal foi mais intensa em Imersão 1, IntraVet, IntraCom e Alim 1, e menos intensa em Imersão 2, enquanto que no controle e Alim 2 foram iguais. O pâncreas com ácinos íntegros na sua totalidade somente foi verificado no tratamento IntraCom, diferindo dos demais grupos, onde Imersão 1, Imersão 2, Alim 1 e Alim

2 foram iguais, mas diferentes do controle e IntraVet. O aspecto balonoso nos hepatócitos não ocorreu em Imersão 1, IntraVet e controle, porém foi mais intensa em Alim 1. Dilatação dos sinusoides foi igual entre Alim 1 e controle, sendo mais intensa quando comparada aos demais grupos. Infiltrados eosinofílicos foram mais intensos em IntraCom quando comparado ao demais grupos. O controle foi menos intenso que IntraCom, porém, mais intenso que Imersão 2 e IntraVet. Infiltrado linfocitário foi menor no grupo controle quando comparado ao grupo IntraCom. Hipertrofia dos hepatócitos em Imersão 2 e controle foi igual e diferentes de IntraCom, que foi mais intenso. A microesteatose foi muito severa em todos os tratamentos após o desafio bacteriano, entretanto em Alim 1 foi menos intensa quando comparada aos demais grupos. As demais lesões no fígado ocorreram sem diferenças estatísticas entre os grupos.

Já no baço, os centros de melanomacrófagos em IntraCom e controle foram iguais e estatisticamente diferentes de Imersão 1, Imersão 2 e Alim 2. Melanomacrófagos foi menor em Imersão 2 quando comparado ao controle, que foi mais intenso. A necrose no baço foi mais intensa no grupo controle quando comparado estatisticamente com Imersão 1. Os grupos Imersão 2, IntraVet, IntraCom e Alim 1 foram iguais entre si. Em Alim 2 não ocorreu necrose esplênica. Infiltrado eosinofílico e esteatose não mostraram diferenças entre os grupos.

A morfometria intestinal dos peixes, nas análises pós-infecção, indicou diferenças estatísticas entre os grupos. O número de vilos foi maior em Imersão 1 quando comparado aos demais tratamentos. IntraCom, Alim 1 e Alim 2 foram iguais ao controle. A altura dos vilos foi menor em Imersão 2 e maior em Alim 1 quando comparados estatisticamente. O número de células caliciformes foi aumentado em Alim 2 quando comparado ao controle, porém Imersão 2, IntraVet e IntraCom foram semelhantes ao controle. Não ocorreu diferença significativa entre os grupos na largura dos vilos e na ocorrência de infiltrados eosinofílicos (Tabela 5).

#### 3.3.4 Atividade enzimática

Ao final do período de 54 dias as análises enzimáticas para atividade de CAT mostraram que ocorreram diferenças significativas entre os grupos, onde o controle e Imersão 1 apresentaram menor atividade quando comparados aos demais tratamentos. IntraVet e IntraCom exibiram maior atividade. Em Imersão 2, Alim 1 e Alim 2 a atividade enzimática permaneceu igual. Para atividade das enzimas SOD



e GST não foram evidenciadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 1).

### 3.3.5 Desafio experimental com *Streptococcus agalactiae*

Foram constatadas diferenças significativas de mortalidade entre os grupos (valor-p 0,0368). Após 24 horas de desafio foi observada mortalidade somente no grupo controle. Em 48 horas os grupos controle, Alim 1 e Alim 2 apresentaram mortalidades. No decorrer das horas subsequentes as mortalidades foram anunciadas pela manifestação dos sinais clínicos característicos da estreptococose, tais como, letargia, opacidade da córnea, exoftalmia, natação errática, perda do apetite, anorexia, equimose, hemorragias. Internamente os animais apresentaram ascite, petéquias no fígado e liquefação dos órgãos (Soto et al., 2016). Ao final do período de 192 horas o grupo IntraCom (controle positivo), o qual os peixes foram imunizados com a vacina comercial *Aquavac*, não apresentou mortalidades, ou seja 100% de sobrevivência, ao contrário do grupo controle, onde os peixes morreram na sua totalidade. Nos demais grupos ao final de 192 horas ocorreram taxas de sobrevivências variadas. 11,1% para Alim 1; 16,7% para IntraVet; 40,7% para Alim 2; 41,4% para Imersão 2 e 47,4% para Imersão 1 (Figura 2). A bactéria *S. agalactiae* foi isolada dos tecidos do fígado por meio do postulado de Koch.

### 3.3.6 Desempenho zootécnico

Durante o período do experimento, de maneira geral, não foram observadas alterações de comportamento nos cardumes dentro dos tanques e os peixes se alimentaram normalmente durante o período. Os animais dos tratamentos Alim 1 e Alim 2 aceitaram prontamente a dieta com o biopromotor nos dias de aplicação das doses via ração. Ao final do período de 54 dias (Tabela 6) os grupos Alim 1 e Alim 2 alcançaram maior peso médio final entre os tratamentos.

Tabela 2: Parâmetros hematoimunológicos (média ± desvio padrão) da tilápia-do-nilo após 54 dias do experimento. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle; VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (p <0,05).

	Imersão 1	Imersão 2	IntraVet	IntraCom	Alim 1	Alim 2	Controle	Valor-p
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> ) <sup>ns</sup>	11,99±2,52	13,59±2,66	14,37±1,80	13,23±2,28	13,23±2,16	13,46±1,93	12,97±0,45	0,298454
VCM (fL) <sup>a</sup>	215,11=14,80 <sup>a</sup>	168,03=14,51 <sup>b</sup>	184,66=21,73 <sup>ab</sup>	153,55=14,02 <sup>b</sup>	196,40=11,88 <sup>ab</sup>	153,92=7,40 <sup>b</sup>	151,90=14,11 <sup>b</sup>	<b>0,019689</b>
CHCM (g dL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	29,61=2,29 <sup>a</sup>	36,93=2,19 <sup>ab</sup>	39,68=2,66 <sup>a</sup>	37,03=2,37 <sup>ab</sup>	31,82=1,44 <sup>ab</sup>	38,27=1,88 <sup>ab</sup>	37,85=2,11 <sup>ab</sup>	<b>0,014943</b>
Hematócrito (%) <sup>a</sup>	40,23=5,89 <sup>ab</sup>	37,33=4,56 <sup>ab</sup>	37,17=5,06 <sup>ab</sup>	36,83=4,61 <sup>ab</sup>	42,00=6,22 <sup>a</sup>	35,58=4,94 <sup>ab</sup>	33,67=1,90 <sup>b</sup>	<b>0,008424</b>
Eritrócitos (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>ns</sup>	2,03±0,11	2,35±0,19	2,22±0,18	2,55±0,18	2,21±0,14	2,34±0,09	2,29±0,12	0,376458
Trombócito (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	50,59±4,92 <sup>a</sup>	29,03=5,10 <sup>b</sup>	34,30=4,25 <sup>ab</sup>	50,47=12,57 <sup>a</sup>	25,32=2,49 <sup>b</sup>	37,27=6,27 <sup>ab</sup>	31,01=5,32 <sup>ab</sup>	<b>0,039411</b>
Leucócito (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	36,07±3,24 <sup>a</sup>	63,74=7,18 <sup>ab</sup>	52,09=7,29 <sup>ab</sup>	69,86=8,66 <sup>a</sup>	55,13=5,48 <sup>ab</sup>	57,44=9,47 <sup>ab</sup>	62,70=5,08 <sup>ab</sup>	<b>0,031139</b>
Neutrófilo (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	9,60=1,67 <sup>a</sup>	6,20=1,28 <sup>ab</sup>	4,70=0,50 <sup>ab</sup>	7,82=1,47 <sup>ab</sup>	3,31=0,61 <sup>b</sup>	7,71=1,41 <sup>ab</sup>	5,81=1,33 <sup>ab</sup>	<b>0,016139</b>
Linfócito (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>ns</sup>	84,86=5,09	103,36=9,21	98,89=8,88	115,37=9,08	100,30=6,11	104,68=4,37	99,34=8,84	0,197960
Monócitos (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>ns</sup>	8,2=1,18	8,08=2,07	7,29=2,43	4,56=0,84	7,25=1,44	4,65=0,85	6,53=1,56	0,466378
Proteína total do soro <sup>ns</sup>	35,84=1,23	38,15=1,41	34,54=2,60	33,99=3,20	35,77=3,32	35,18=2,63	35,57=3,01	0,973297
Imunoglobulina Total <sup>ns</sup>	9,91=12,44	26,26=4,18	20,91=1,79	18,54=1,98	18,72=1,69	10,68=8,35	19,29=3,27	0,535270
Aglutinação <sup>ns</sup>	4,06=0,47	4,06=0,47	3,92=0,33	3,58=0,58	3,92=0,33	3,92=0,33	3,58=0,58	0,973685
Antimicrobiano <sup>ns</sup>	9,00=0,00	9,00=0,00	9,33=0,33	9,00=0,00	8,00=1,15	9,67=0,33	9,00=0,58	0,485235

Tabela 3: Parâmetros hematoimunológicos (média ± desvio padrão) da tilápia-do-nilo após o desafio experimental com *S. agalactiae*. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle; VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (p <0,05).

	Imersão 1	Imersão 2	IntraVet	IntraCom	Alim 1	Alim 2	Controle	Valor-p
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	7,67±0,43 <sup>ab</sup>	6,84±0,61 <sup>b</sup>	8,45=0,79 <sup>ab</sup>	9,72=0,36 <sup>a</sup>	7,75=0,69 <sup>ab</sup>	7,60=0,40 <sup>b</sup>	7,74=0,48 <sup>ab</sup>	<b>0,002623</b>
VCM (fL) <sup>a</sup>	178,57=14,81	141,89=9,81	175,97=12,83	165,35=10,42	192,43=20,95	175,43=11,99	194,54=33,97	0,420926
CHCM (g dL <sup>-1</sup> ) <sup>ns</sup>	28,28=2,13	26,55=2,18	35,53=4,79	26,59=1,15	26,44=3,87	24,55=1,47	33,82=4,59	0,179547
Hematócrito (%) <sup>a</sup>	27,67=1,33 <sup>ab</sup>	26,00=1,80 <sup>b</sup>	26,11=2,72 <sup>b</sup>	36,89=1,54 <sup>a</sup>	32,67=3,72 <sup>ab</sup>	31,44=1,74 <sup>ab</sup>	25,00=2,62 <sup>b</sup>	<b>0,005100</b>
Eritrócitos (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>ns</sup>	1,63±0,15 <sup>ab</sup>	1,87=0,14 <sup>ab</sup>	1,56=0,17 <sup>b</sup>	2,28=0,13 <sup>a</sup>	1,77=0,22 <sup>ab</sup>	1,83=0,10 <sup>ab</sup>	1,41=0,15 <sup>b</sup>	<b>0,008544</b>
Trombócito (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	7,94=2,03 <sup>b</sup>	10,44=3,55 <sup>ab</sup>	9,2=2,64 <sup>a</sup>	23,24=3,29 <sup>a</sup>	7,45=1,64 <sup>ab</sup>	12,40=2,70 <sup>ab</sup>	10,16=2,43 <sup>ab</sup>	<b>0,010160</b>
Leucócito (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	27,25=3,11 <sup>b</sup>	52,99=12,43 <sup>ab</sup>	35,00=4,37 <sup>ab</sup>	69,10=3,73 <sup>a</sup>	45,35=10,96 <sup>ab</sup>	44,19=7,94 <sup>ab</sup>	27,94=6,65 <sup>b</sup>	<b>0,002406</b>
Neutrófilo (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>ns</sup>	31,54=4,65	32,86=5,82	23,01=3,15	23,04=4,18	38,53=8,56	37,21=6,25	18,33=4,25	0,082812
Linfócito (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	29,07=4,81 <sup>a</sup>	39,71=6,59 <sup>a</sup>	37,37=7,88 <sup>a</sup>	82,00=8,17 <sup>a</sup>	32,56=4,19 <sup>a</sup>	34,36=5,74 <sup>a</sup>	27,54=4,52 <sup>a</sup>	<b>0,000001</b>
Monócitos (×10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	20,72=3,49 <sup>ab</sup>	20,99=2,53 <sup>ab</sup>	17,84=3,96 <sup>ab</sup>	9,18=1,32 <sup>b</sup>	24,91=2,79 <sup>a</sup>	19,71=2,71 <sup>ab</sup>	22,77=3,17 <sup>a</sup>	<b>0,015606</b>
Proteína total do soro <sup>ns</sup>	35,09=2,04	35,27=1,60	35,20=1,76	43,42=4,18	48,40=7,98	40,84=0,60	34,38=1,07	0,102092
Imunoglobulina Total <sup>ns</sup>	21,44=1,13	20,53=2,23	20,91=2,95	27,24=2,98	32,10=8,65	24,29=0,61	20,84=1,17	0,308530
Aglutinação <sup>ns</sup>	4,25=0,33	4,39=0,42	4,72=0,14	4,25=0,33	4,58=0,00	5,97=1,19	4,25=0,33	0,286580
Antimicrobiano <sup>ns</sup>	9,00=0,58	9,00=0,58	8,33=0,67	9,00=0,00	8,33=0,67	8,00=0,00	8,33=1,20	0,862024

Tabela 4: Intensidade das alterações histológicas no fígado, baço, brânquias e intestino (média ± desvio padrão) da tilápia-do-nylo após 54 dias de experimento. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (p <0,05). (0) indicam ausência de lesão.

<b>Lesões no Fígado</b>	<b>Imersão 1</b>	<b>Imersão 2</b>	<b>IntraVet</b>	<b>IntraCom</b>	<b>Alim 1</b>	<b>Alim 2</b>	<b>Controle</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Perda do aspecto cordal</i> <sup>aa</sup>	1,87±0,22	1,85±0,22	2,00±0,18	1,71±0,21	2,13±0,18	1,73±0,21	2,00±0,21	0,742158
<i>Perda da estrutura nos pâncreas</i> <sup>aa</sup>	0,13±0,09	0,15±0,10	0	0,24±0,11	0,06±0,06	0	0	0,098151
<i>Hepatócito balonoso</i> <sup>a</sup>	0,13±0,09 <sup>b</sup>	0	0,93±0,34 <sup>a</sup>	0,35±0,19 <sup>b</sup>	0,81±0,21 <sup>ab</sup>	0,47±0,22 <sup>b</sup>	0,41±0,17 <sup>b</sup>	<b>0,020330</b>
<i>Congestão de grandes vasos</i> <sup>aa</sup>	1,27±0,18	1,46±0,22	1,07±0,16	1,53±0,15	1,81±0,21	1,47±0,19	1,29±0,14	0,125064
<i>Congestão do pâncreas vs</i>	1,40±0,16	1,38±0,21	1,21±0,15	1,47±0,17	1,63±0,20	1,47±0,19	1,23±0,16	0,699188
<i>Congestão dos sinusoides</i> <sup>a</sup>	1,53±0,13 <sup>a</sup>	1,62±0,14 <sup>a</sup>	1,50±0,14 <sup>a</sup>	1,41±0,12 <sup>ab</sup>	0,88±0,15 <sup>b</sup>	0,87±0,13 <sup>b</sup>	1,12±0,17 <sup>ab</sup>	<b>0,000277</b>
<i>Dilatação sinusoidal</i> <sup>a</sup>	1,00±0,14 <sup>ab</sup>	1,23±0,23 <sup>a</sup>	1,21±0,24 <sup>a</sup>	1,06±0,20 <sup>a</sup>	0,44±0,18 <sup>b</sup>	0,47±0,13 <sup>b</sup>	0,88±0,17 <sup>ab</sup>	<b>0,009350</b>
<i>Infiltrado eosinofílico</i> <sup>aa</sup>	1,13±0,13	0,92±0,18	0,71±0,16	0,76±0,16	1,13±0,15	1,00±0,14	1,18±0,15	0,208470
<i>Infiltrado linfocitário</i> <sup>aa</sup>	0,73±0,15	0,77±0,17	0,93±0,20	0,88±0,19	1,06±0,17	0,73±0,11	1,00±0,12	0,658973
<i>Hiperplasia dos hepatócitos</i> <sup>a</sup>	0,73±0,23 <sup>c</sup>	0,77±0,28 <sup>bc</sup>	2,43±0,23 <sup>a</sup>	1,71±0,22 <sup>ab</sup>	1,25±0,21 <sup>b</sup>	0,80±0,20 <sup>c</sup>	0,88±0,19 <sup>bc</sup>	<b>0,000001</b>
<i>Hiperplasia do núcleo dos hepatócitos</i> <sup>aa</sup>	0	0,08±0,08	0,21±0,11	0,12±0,08 <sup>b</sup>	0	0	0,06±0,06	0,170439
<i>Macroesteatose</i> <sup>aa</sup>	0,13±0,09	0,31±0,17	0,29±0,13	0,18±0,10	0,31±0,15	0	0,12±0,08	0,381781
<i>Microesteatose</i> <sup>a</sup>	0,33±0,13 <sup>b</sup>	0,23±0,12 <sup>b</sup>	1,29±0,35 <sup>a</sup>	0,88±0,27 <sup>ab</sup>	0,94±0,19 <sup>ab</sup>	1,13±0,32 <sup>a</sup>	0,65±0,17 <sup>ab</sup>	<b>0,024780</b>
<i>Necrose</i> <sup>a</sup>	0,93±0,18	0,85±0,10	1,07±0,13	0,76±0,14	0,94±0,06	0,87±0,09	0,82±0,10	0,658973
<i>Núcleo com plicose</i> <sup>a</sup>	0,13±0,05 <sup>a</sup>	0	0,02±0,02 <sup>b</sup>	0,15±0,06 <sup>b</sup>	0,05±0,03 <sup>b</sup>	0	0,06±0,06 <sup>b</sup>	<b>0,005389</b>
<i>Perda de núcleo dos hepatócitos</i> <sup>aa</sup>	0	0,02±0,02	0,03±0,03	0	0	0	0,06±0,06	0,562716
<b>Lesões Baço</b>	<b>Imersão 1</b>	<b>Imersão 2</b>	<b>IntraVet</b>	<b>IntraCom</b>	<b>Alim 1</b>	<b>Alim 2</b>	<b>Controle</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Centro de melanomacrófaços</i> <sup>aa</sup>	1,30±0,15	0,86±0,14	1,2±0,28	1,38±0,21	0,91±0,09	0,82±0,12	0,88±0,13	0,083301
<i>Melanomacrófaços</i> <sup>aa</sup>	1,30±0,15	1,14±0,14	1,11±0,20	1,17±0,26	1,18±0,12	1,18±0,12	1,13±0,13	0,081204
<i>Infiltrado eosinofílico vs</i>	0,60±0,16	1,14±0,14	0,67±0,17	0,54±0,18	0,73±0,14	0,91±0,09	0,88±0,13	0,139530
<i>Infiltrado linfocitário</i> <sup>aa</sup>	0	0	0	0	0	0,09±0,09	0	0
<i>Congestão dos vasos</i> <sup>aa</sup>	2,20±0,36	2,00±0,53	1,78±0,43	2,38±0,29	2,64±0,20	3,00±0,00	2,89±0,13	0,065998
<i>Esteatose</i> <sup>a</sup>	1,70±0,30 <sup>a</sup>	1,00±0,22 <sup>ab</sup>	0,67±0,33 <sup>ab</sup>	0,54±0,14 <sup>ab</sup>	0,55±0,21 <sup>ab</sup>	1,00±0,23 <sup>ab</sup>	0,25±0,16 <sup>b</sup>	<b>0,017472</b>
<i>Aspecto de Hemosiderina</i> <sup>a</sup>	1,00±0,33 <sup>ab</sup>	0,43±0,20 <sup>b</sup>	0,56±0,17 <sup>b</sup>	1,31±0,33 <sup>ab</sup>	1,82±0,30 <sup>a</sup>	1,57±0,37 <sup>a</sup>	1,00±0,19 <sup>ab</sup>	<b>0,027613</b>
<b>Lesões na Brânquia</b>	<b>Imersão 1</b>	<b>Imersão 2</b>	<b>IntraVet</b>	<b>IntraCom</b>	<b>Alim 1</b>	<b>Alim 2</b>	<b>Controle</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Aneurisma</i> <sup>aa</sup>	0,14±0,14	0,13±0,13	0	0,22±0,15	0,14±0,14	0,17±0,17	0,50±0,34	0,637789
<i>Congestão da base das lamelas</i> <sup>aa</sup>	1,43±0,20	1,25±0,25	0,67±0,21	1,11±0,35	1,43±0,30	1,17±0,48	1,17±0,31	0,717438
<i>Congestão do veio central</i> <sup>a</sup>	0,29±0,18 <sup>b</sup>	0,88±0,30 <sup>a</sup>	0,67±0,42 <sup>ab</sup>	1,11±0,31 <sup>a</sup>	0	0	0,17±0,17 <sup>b</sup>	<b>0,010932</b>
<i>Dilatação do veio central</i> <sup>a</sup>	0,29±0,18 <sup>b</sup>	0,88±0,30 <sup>a</sup>	0,67±0,42 <sup>ab</sup>	1,11±0,31 <sup>a</sup>	0	0	0,33±0,21 <sup>ab</sup>	<b>0,016915</b>
<i>Descolamento da lamela secundária</i> <sup>aa</sup>	0	0	0	0,03±0,03	0	0	0	0
<i>Dilatação do seio venoso</i> <sup>aa</sup>	0	0	0	0,10±0,05	0	0,05±0,05	0	0,076585
<i>Edema justalamelar</i> <sup>a</sup>	2,00±0,31 <sup>ab</sup>	1,13±0,30 <sup>ab</sup>	0,83±0,31 <sup>b</sup>	2,67±0,17 <sup>a</sup>	2,29±0,36 <sup>ab</sup>	1,33±0,49 <sup>ab</sup>	1,67±0,56 <sup>ab</sup>	<b>0,004347</b>
<i>Fusão das lamelas secundárias</i> <sup>aa</sup>	0,13±0,06	0	0	0,07±0,04	0,13±0,06	0,05±0,05	0,17±0,17	0,246187
<i>Hiperplasia interlamelar</i> <sup>aa</sup>	1,43±0,20	0,88±0,23	1,00±0,37	1,56±0,18	1,57±0,20	1,00±0,37	1,33±0,33	0,277712
<i>Hiperplasia da lamela secundária</i> <sup>aa</sup>	0,29±0,18	0,38±0,26	0,33±0,21	0,67±0,17	0,43±0,30	0,33±0,21	0,83±0,31	0,639860
<i>Hiperplasia das células caliciformes</i> <sup>aa</sup>	0,29±0,18	0,13±0,13	0,33±0,21	0,22±0,22	0,71±0,36	0,17±0,17	0,17±0,17	0,547051
<i>Infiltrado eosinofílico</i> <sup>aa</sup>	0,71±0,18	0,38±0,18	0,50±0,22	0,44±0,18	0,71±0,18	0,67±0,33	0,33±0,21	0,745789
<i>Telangiectasia</i> <sup>aa</sup>	0	0,25±0,16	0,33±0,21	0,33±0,17	0,29±0,18	0,17±0,17	0,17±0,17	0,781137
<i>Eptilicostis</i> <sup>aa</sup>	0,29±0,18	0,25±0,16	0	0,56±0,18	0,14±0,14	0,17±0,17	0	0,138077
<b>Morfometria do Intestino</b>	<b>Imersão 1</b>	<b>Imersão 2</b>	<b>IntraVet</b>	<b>IntraCom</b>	<b>Alim 1</b>	<b>Alim 2</b>	<b>Controle</b>	<b>Valor-p</b>
<i>Vilos</i> <sup>aa</sup>	31,00±2,52	30,33±2,27	28,09±2,25	29,68±3,31	28,07±1,51	30,67±3,12	25,17±1,30	0,640721
<i>Altura</i> <sup>aa</sup>	307,77±23,58	384,49±34,44	330,86±47,44	400,37±3,39	369,18±15,29	392,29±43,16	295,74±29,65	0,173757
<i>Largura</i> <sup>aa</sup>	119,73±10,37	106,96±2,04	117,93±11,22	123,87±6,61	123,63±6,64	122,93±11,68	128,25±2,54	0,659923
<i>Células caliciformes</i> <sup>aa</sup>	8,64±0,93	13,87 ± 1,02	14,26 ± 2,51	12,49 ± 0,88	11,30 ± 0,91	10,55 ± 0,35	11,54 ± 1,43	0,104567
<i>Infiltrado eosinofílico</i> <sup>aa</sup>	1,00±0,00	1,11±0,11	0,91±0,27	0,82±0,10	1,47±0,15	1,07±0,07	1,00±0,00	0,081912

Tabela 5: Intensidade das alterações histológicas no fígado, baço e intestino (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nylo após desafio experimental com *S. agalactiae*. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200  $\mu$ L por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50  $\mu$ L por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100  $\mu$ L do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200  $\mu$ L do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). (0) indicam ausência de lesão.

Lesões no Fígado	Imersão 1	Imersão 2	IntraVet	IntraCom	Alim 1	Alim 2	Controle	Valor-p
Perda do aspecto cordal <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	2,13 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	2,67 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	2,33 $\pm$ 0,21 <sup>ab</sup>	0,023040
Perda da estrutura nos pâncreas <sup>a</sup>	0,60 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,60 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,35 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0	0,60 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,60 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	1,67 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	0,00000001
Hepatócito balonoso <sup>a</sup>	0	0,13 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0	0,80 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup>	1,33 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	0	0,000897
Congestão de grandes vasos <sup>aa</sup>	1,50 $\pm$ 0,29	1,38 $\pm$ 0,18	1,00 $\pm$ 0,41	1,80 $\pm$ 0,37	1,67 $\pm$ 0,33	1,67 $\pm$ 0,33	1,00 $\pm$ 0,37	0,473408
Congestão do pâncreas <sup>aa</sup>	1,50 $\pm$ 0,29	1,63 $\pm$ 0,26	1,50 $\pm$ 0,29	1,80 $\pm$ 0,37	1,67 $\pm$ 0,33	1,33 $\pm$ 0,33	1,00 $\pm$ 0,37	0,658741
Congestão sinusoidal <sup>aa</sup>	1,25 $\pm$ 0,25	0,63 $\pm$ 0,18	1,25 $\pm$ 0,25	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 0,33	0,50 $\pm$ 0,22	0,086211
Dilatação dos sinusoides <sup>a</sup>	0	0,04 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0	0	0,30 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0	0,33 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,001103
Infiltrado eosinofílico <sup>a</sup>	0	0,08 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,08 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0	0	0,25 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,002979
Infiltrado linfocitário <sup>a</sup>	0	0	0	0,24 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0	0	0,15 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,000456
Hipertrofia dos hepatócitos <sup>a</sup>	0	0,13 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0	1,80 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>	0	0,33 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	0,17 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	0,005027
Macroesteatose <sup>aa</sup>	0	0	0	0,10 $\pm$ 0,10	0,16 $\pm$ 0,16	0	0,08 $\pm$ 0,08	0,575199
Microesteatose <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	2,60 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	2,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,000004
Necrose <sup>aa</sup>	0,30 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00	1,17 $\pm$ 0,17	0,407655
Lesões no Baço	Imersão 1	Imersão 2	IntraVet	IntraCom	Alim 1	Alim 2	Controle	Valor-p
Centro de melanomacrófagos <sup>a</sup>	1,33 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	1,33 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	2,33 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	1,80 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup>	1,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	2,75 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	0,000724
Melanomacrófagos <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	0,10 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,30 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	0,35 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	0,24 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,20 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>	0,48 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,008998
Necrose <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	1,00 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	1,00 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	1,00 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	1,00 $\pm$ 0,00 <sup>ab</sup>	0	1,25 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	0,000668
Infiltrado eosinofílico <sup>aa</sup>	0,20 $\pm$ 0,10	0,30 $\pm$ 0,00	0,36 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,07	0,30 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00	0,249761
Congestão dos vasos <sup>a</sup>	2,67 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	2,33 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	1,40 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	3,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	2,25 $\pm$ 0,75 <sup>ab</sup>	0,038503
Esteatose <sup>aa</sup>	0,46 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,06	0,30 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,13	0,406217
Morfometria do intestino	Imersão 1	Imersão 2	IntraVet	IntraCom	Alim 1	Alim 2	Controle	Valor-p
Vilos <sup>a</sup>	26,67 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup>	23,00 $\pm$ 0,58 <sup>ab</sup>	21,67 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	20,67 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>	19,67 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>	18,67 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	20,67 $\pm$ 1,33 <sup>b</sup>	0,006025
Altura <sup>a</sup>	324,59 $\pm$ 41,44 <sup>ab</sup>	243,52 $\pm$ 12,16 <sup>b</sup>	274,00 $\pm$ 14,09 <sup>ab</sup>	383,41 $\pm$ 18,18 <sup>ab</sup>	426,09 $\pm$ 35,77 <sup>a</sup>	325,42 $\pm$ 28,02 <sup>ab</sup>	268,47 $\pm$ 64,90 <sup>ab</sup>	0,025179
Largura <sup>aa</sup>	117,29 $\pm$ 8,46	115,14 $\pm$ 16,81	120,87 $\pm$ 6,46	144,83 $\pm$ 21,71	122,99 $\pm$ 2,68	121,88 $\pm$ 5,68	97,22 $\pm$ 11,30	0,307404
Células calcificadas <sup>a</sup>	19,28 $\pm$ 2,47 <sup>ab</sup>	16,51 $\pm$ 2,69 <sup>b</sup>	15,35 $\pm$ 2,65 <sup>b</sup>	18,72 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	27,49 $\pm$ 5,05 <sup>ab</sup>	34,61 $\pm$ 4,80 <sup>a</sup>	18,57 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	0,008361
Infiltrado eosinofílico <sup>aa</sup>	1,00 $\pm$ 0,00	1,33 $\pm$ 0,33	1,33 $\pm$ 0,33	1,67 $\pm$ 0,33	1,00 $\pm$ 0,00	1,33 $\pm$ 0,33	1,33 $\pm$ 0,33	0,678101

Figura 1: Atividade específica de enzimas antioxidantes no fígado de tilápia-do-nylo após 54 dias de experimento. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200 µL por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50 µL por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100 µL do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200 µL do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle. Catalase (CAT); Superóxido dismutase (SOD); Glutaciona S-transferase (GST).

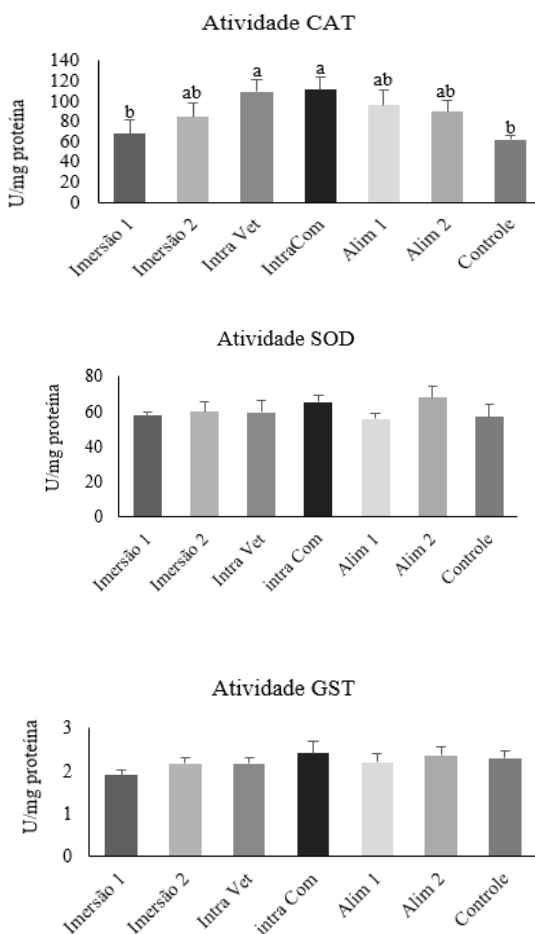


Tabela 6: Parâmetros de crescimento (média  $\pm$  desvio padrão) da tilápia-do-nylo após 54 dias do experimento. SGR = taxa de crescimento específica, FE = eficiência alimentar, FW = Peso Final, FL = Comprimento Final. Na imersão 1 = 500 mL do biopromotor diluído em 4,5 L de água; em imersão 2 = 1000 mL do biopromotor diluído em 4,0 L de água; IntraVet = injeção intraperitoneal de 200  $\mu$ L por peixe; IntraCom = injeção intraperitoneal de Aquavac 50  $\mu$ L por peixe (controle positivo); Alim 1 = na via oral 100  $\mu$ L do biopromotor e Alim 2 = na via oral foram adicionados 200  $\mu$ L do biopromotor a cada grama de ração oferecida e grupo controle.

	<i>Imersão 1</i>	<i>Imersão 2</i>	<i>IntraVet</i>	<i>IntraCom</i>	<i>Alim 1</i>	<i>Alim 2</i>	<i>Controle</i>
<i>SGR (% dia<sup>-1</sup>)</i>	3,54 $\pm$ 0,18	3,53 $\pm$ 0,15	3,48 $\pm$ 0,23	3,55 $\pm$ 0,13	3,59 $\pm$ 0,15	3,63 $\pm$ 0,12	3,48 $\pm$ 0,04
<i>FE</i>	0,71 $\pm$ 0,13	0,90 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,18	0,90 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,05	0,70 $\pm$ 0,01
<i>FW (g)</i>	58,62 $\pm$ 2,24 <sup>ab</sup>	58,07 $\pm$ 1,59 <sup>ab</sup>	54,44 $\pm$ 2,37 <sup>b</sup>	59,31 $\pm$ 1,49 <sup>ab</sup>	62,17 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>	65,33 $\pm$ 1,65 <sup>a</sup>	53,10 $\pm$ 1,00 <sup>b</sup>
<i>FL (cm)</i>	14,39 $\pm$ 0,33 <sup>ab</sup>	14,41 $\pm$ 0,26 <sup>ab</sup>	14,58 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup>	14,41 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>	15,13 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	15,20 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	13,85 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>

Figura 2: Gráfico da mortalidade acumulada da tilápia-do-nylo após infecção pelo patógeno bacteriano *S. agalactiae*.

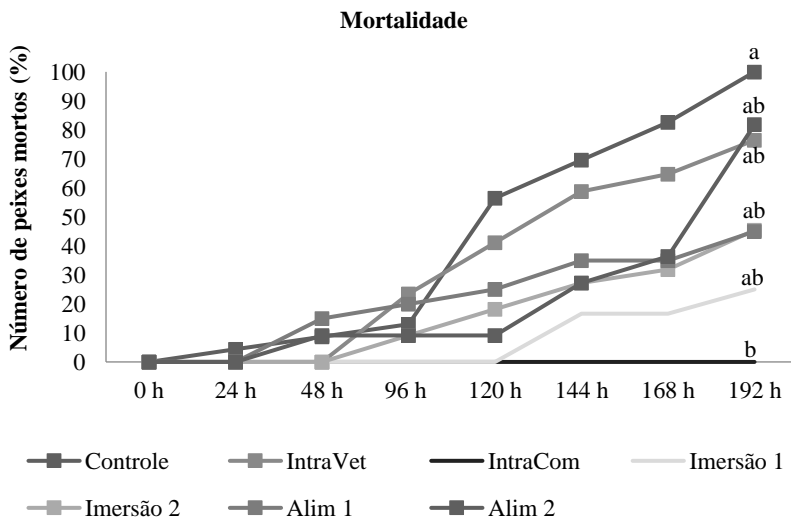


Figura 3: Alterações histológicas em tilápia-do-nylo após o 54º dia de experimentação. A: Tecido hepático de peixe grupo IntraVet com microesteatose; B: Infiltrados eosinofílicos (seta) e necrose (cabeça de seta) em tecido hepático de peixes grupo controle; C: Aspecto de hemosiderina em tecido do baço de peixe do grupo Alim 1; D: Esteatose no tecido do baço de peixe controle. Coloração: HH & E, Barra: 50 µm.

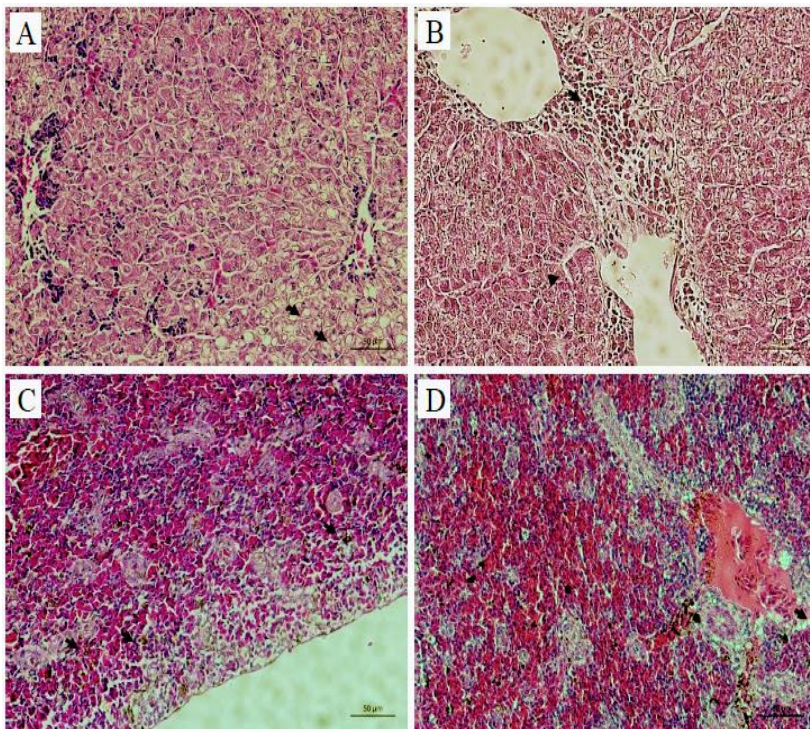
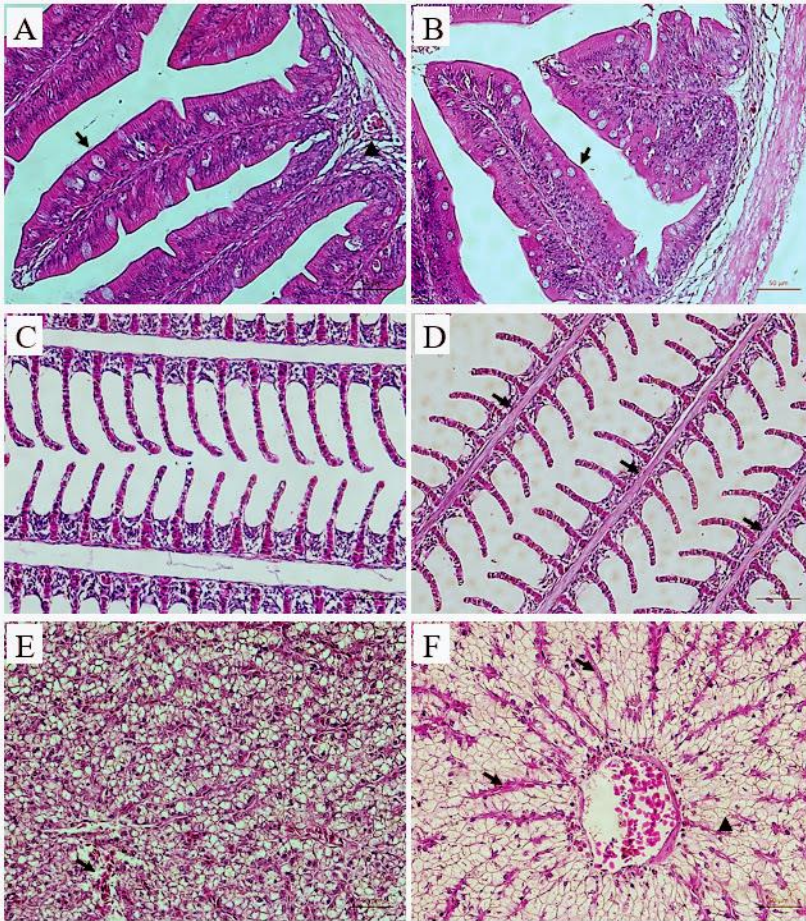


Figura 4: Alterações histológicas na tilápia-do-nilo após o 54º dia de experimentação. A: Secção do intestino de tilápia grupo controle, onde é possível observar as células caliciformes; B: Secção do intestino de tilápia grupo Alim 1, onde é possível observar as células caliciformes; C: Tecido de brânquia de peixe grupo Alim 2, em perfeitas condições; D: Tecido de brânquia de peixe grupo controle com congestão do veio central; E: Tecido hepático de peixe do grupo IntraCom, presença leve de infiltrado eosinofílico; F: Tecido hepático de peixe do grupo Imersão 1, onde pode ser observada a congestão de sinusoides (seta) e aspecto balonoso dos hepatócitos (cabeça de seta). Coloração: HH & E, Bar: 50 µm.





### 3.4 DISCUSSÃO

Embora o uso de antibióticos ainda seja recorrente para controlar infecções bacterianas em peixes, pesquisas que buscam alternativas para substituir os antibióticos na aquicultura são cada vez mais frequentes (Amal; Zamri-Saad, 2011; Ahmadi et al., 2012; Yilmaz et al., 2013; Shakya, 2015; Brum et al., 2017; Maji et al., 2017), e devido à grande diversidade de peixes que estão sendo cultivados, diferenças consideráveis podem ser encontradas entre alguns elementos importantes do sistema imunológico. (Pohlenz; Gatlin, 2014). O sistema imunológico dos peixes teleósteos é muito similar ao encontrado em vertebrados superiores, constituído como um mecanismo de defesa altamente complexo que utiliza uma ampla gama de componentes individuais (Warr, 1995; Tort et al., 2003; Sunyer, 2013). O presente estudo verificou o uso de um biopromotor e seus efeitos sobre os mecanismos do sistema imune de tilápias nilóticas.

Os componentes alimentares não digeríveis podem exercer influência no sistema imune do intestino por meio da estimulação do metabolismo das bactérias autóctones (Gourbeyre et al., 2011; Kiron, 2012) e na aquicultura, como imunoestimulantes, tem sido destacado particularmente em duas espécies de peixes teleósteos, *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax*, podendo abrir as portas para o pioneirismo de um novo modelo de componentes alternativos aos agentes antimicrobianos (Carbone; Faggio, 2016). O estado fisiológico dos peixes pode ser refletido nos índices hematológicos como hematócrito, níveis de neutrófilos, trombócitos, pois, podem determinar a capacidade do peixe para resistir a doenças, além disso, os imunomoduladores podem induzir atividades elevadas nos mecanismos de defesa inespecíficos, como aumento da atividade oxidativa de neutrófilos, aumento de atividade de células fagocíticas ou potencialização de células citotóxicas (Anderson, 1992; Magnadottir, 2006). Na hematologia do presente estudo dois momentos distintos foram observados, uma análise aos 54 dias e outra após o desafio. Em um primeiro momento (Tabela 2) observamos o desenvolvimento de um quadro característico de efeitos imunomodulatórios nos animais, exibindo um aumento significativo nos níveis hematológicos dos peixes tratados quando comparados ao grupo controle, com isso, acreditamos que houve estimulação da resposta imune inata dos animais.

Segundo Brudeseth et al. (2013), a administração de vacinas é realizada oralmente através da ração, por imersão em suspensões diluídas e por injeção via intraperitoneal, onde geralmente, o nível e a duração da

eficácia são maiores com o método de injeção, porém causando mais estresse ao peixe. Acreditamos que no presente estudo, o fator estresse, relacionado aos manejos de aplicações intraperitoneal e imersão, não foi refletido no hemograma devido ao tempo decorrido entre as aplicações e coleta do material para análises.

No presente estudo os resultados hematológicos diferem das quantificações encontradas por Telli et al. (2014), quando utilizaram o probiótico *Bacillus subtilis* adicionado à dieta de *O. niloticus* cultivadas sob diferentes densidades; Ranzani-Paiva et al. (2004), quando desafiaram *O. niloticus* com o patógeno *Mycobacterium marinum*; Brum et al. (2017) quando verificaram o efeito da inclusão do óleo essencial de manjeriço e gengibre na dieta de *O. niloticus*; e Tavares-Dias e Moraes (2007), quando verificaram o perfil hematológicos de *Ictalurus punctatus*. Entretanto, apesar de haver uma variação no perfil hematológico entre as diversas espécies de peixes, a resposta imune global segue um padrão (Pohlenz; Gatlin, 2014), ainda que as situações de manutenção sejam diversas. No presente estudo os valores encontrados na hematologia dos animais do grupo controle basal e do grupo controle positivo imunizado com vacina *Aquavac* (IntraCom), serviram como referência hematológica basal e como referência de uma situação de imunomodulação e imunestimulação para tilápias-do-nylo. Portanto, ao compararmos os peixes dos grupos tratados com os grupos referência, verificamos que o tratamento proporcionou uma melhora da imunidade inata desses animais.

Já no período pós-infecção, as alterações hematológicas (Tabela 3), retrataram um quadro clínico característico de peixes afetados pela bactéria *S. agalactiae*. O número de neutrófilos e monócitos apresentou-se elevado com uma queda na quantidade de leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina, trombócitos e linfócitos em relação às análises pré-infecção. Conforme Zachary et al. (2012), os eritrócitos são células que circulam por longo tempo na corrente sanguínea e quando ocorre algum processo de inflamação a quantidade de eritrócitos diminui, mas são normais em tamanho e concentração de hemoglobina, que é o pigmento normal dos eritrócitos. Assim, os valores de volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) estão intimamente ligados a hemoglobina corpuscular média (HCM), dessa maneira, excessos extracelulares de hemoglobina podem alterar esses índices, causando um aumento artificial de HCM e CHCM. Sendo assim, conseqüentemente, uma redução na quantidade de eritrócitos implica em níveis mais baixos de hemoglobina, como foi verificado no período pós-infecção do presente estudo.

A Trombocitopenia pode estar relacionada ao aumento do consumo e destruição de trombócitos, alterações na sua distribuição e hemorragias. O baço, um órgão ligado diretamente a produção dessas células, quando afetado por quaisquer anormalidades pode refletir no número de trombócitos circulantes (Zachary et al., 2012). Isso nos leva acreditar que a infecção é a principal causadora da trombocitopenia, pois, proporcionou um quadro infeccioso agudo nos peixes e provavelmente afetou órgãos, como o baço.

Martins et al. (2008), ao verificarem alterações hematológicas em tilápias infectadas experimentalmente com *Enterococcus* sp. mostraram que o número total de trombócitos, linfócitos e hematócrito foram afetados pela injeção bacteriana. Já Brum et al. (2017), após desafiarem tilápias-do-nilo suplementadas com óleo essencial de gengibre e manjerição com a bactéria *S. agalactiae* também verificou o aumento de neutrófilos circulantes e queda na quantidade de linfócitos e leucócitos totais, atribuindo essa alteração ao quadro infeccioso, onde a migração de leucócitos ocorre em direção aos sítios de infecção. Alsaid et al. (2015), afirmam que o aumento de leucócitos totais em tilápia híbrida (*Oreochromis sp.*) infectadas por *S. agalactiae* trata-se de uma resposta natural do sistema imune inato induzida pela presença de patógenos. Zachary et al. (2012), também afirmam que diante de um quadro inflamatório, os neutrófilos têm como objetivo eliminar micro-organismos ou corpos estranhos. Parece que essas alterações podem variar em cada situação, entretanto, no presente estudo acreditamos que os animais que receberam o biopromotor apresentaram uma melhora considerável nos índices hematológicos.

Em relação aos parâmetros imunológicos séricos, não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle, nem antes e nem após o desafio. De mesmo modo, Brum et al. (2018), quando verificaram os parâmetros bioquímicos sanguíneos em tilápia nilótica suplementadas com óleos essenciais de manjerição e gengibre, não observaram diferenças significativas entre os tratamentos para proteínas totais séricas e imunoglobulinas e relatam que isto poderia ser um benefício, uma vez que não há estímulo excessivo dos mecanismos de defesa que consomem energia, sendo ativados apenas contra patógenos. Entretanto, no presente estudo, observamos que no período pós-infecção a proteína sérica total aumentou em IntraCom, Alim 1 e Alim 2 com relação ao período pré-infecção. Segundo Melo et al. (2009), essas mudanças na concentração total de proteínas séricas podem estar relacionadas com alterações no volume plasmático, e qualquer estresse sofrido pelos animais pode alterar os valores totais de proteína. De mesmo

modo, as imunoglobulinas pós-infecção foram aumentadas em Imersão 1, IntraCom, Alim 1 e Alim 2 em relação ao período pré-desafio. Segundo Swain et al. (2006), as imunoglobulinas atuam diretamente na aglutinação de patógenos. Ainda que não tenha ocorrido diferenças significativas entre os grupos, o aumento da quantificação de proteínas totais e imunoglobulinas após a infecção pode nos direcionar para um entendimento, no qual, os peixes desses tratamentos tiveram melhorias nos mecanismos de defesa no momento em que o patógeno foi inoculado no organismo.

As investigações histopatológicas são capazes de diferenciar lesões em órgãos, induzidas por doenças ou por outros fatores ambientais. A análise estereotécnica fornece dados quantitativos sobre lesões patológicas, aumentando assim, a probabilidade de identificar as relações de causa e efeito (Schwaiger et al., 1997). Segundo Cao et al. (2016), o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo de compostos endógenos e exógenos sendo um dos primeiros órgãos alvo para a ação tóxica de estressores. Essa informação corrobora com os resultados observados no presente estudo, onde as análises histológicas pré-infecção e pós-infecção revelaram que o fígado foi o órgão que apresentou maiores alterações significativas entre os tratamentos.

O presente estudo revelou que nas análises histológicas do 54º dia mais de 80% das lesões de menor intensidades foram nos grupos tratados. Esse fato, possivelmente, pode estar relacionado com a administração do biopromotor que promoveu melhorias na saúde dos peixes desses grupos em relação aos peixes do grupo controle. Yunis-Aguinaga et al. (2015), também verificaram uma melhora dos aspectos sanitários e imunológicos em *O. niloticus* desafiadas com *S. agalactiae* após a suplementação dietária com *Uncaria tomentosa*, e não observaram lesões histopatológicas em brânquias, intestino e fígado, no entanto, observaram que no baço houve hiperemia nos peixes suplementados com as maiores concentrações da planta. Já Brum et al. (2018), ao investigarem mudanças histológicas em tilápia-do-nilo suplementadas 55 dias com óleos essenciais de manjeriço e gengibre, observaram no tecido hepático uma variedade de lesões, porém os grupos diferiram estatisticamente apenas em congestão nos sinusoides e núcleos com picnose.

Aos 54 dias de experimento a esteatose no baço foi mais elevada nos grupos tratados, onde também foram observadas deposições de pigmentos com aspecto de hemosiderina. A hemosiderina pode estar presente na composição química de macrófagos, bem como a melanina e a lipofuscina (Wolke et al., 1985). A presença de melanina em

macrófagos no baço pode estar relacionada à resposta imune do organismo do peixe (Kowalska et al, 2011), entretanto o papel da melanina nos agregados de macrófagos não é bem esclarecido, mas pode estar envolvida na proteção celular, atuando na conversão de ânions ( $O_2^-$ ) em situações de estresse oxidativo (Wolke et al., 1985). Fishelson (2006), ao verificar alterações citomorfológicas no baço de peixes cardinais (Apogonidae), como bioindicadores do estresse, observou que os centros de melanomacrófagos armazenam grânulos de melanina em seu citoplasma e geralmente aparecem marrom ou marrom escuro devido a hemossiderina e que, no baço de peixes de locais poluídos, o número de centros de melanomacrófagos revelaram massas maiores de deposição de hemossiderina em comparação com peixes da mesma espécie dos locais designados como controle. No presente estudo, a presença de maiores deposições de hemossiderina no baço dos peixes dos grupos Alim 1 e Alim 2, pode ser justificada como um aumento da resposta imunológica dos animais nesses tratamentos, uma vez que, a quantidade aumentada de pigmentos oriundos dos agregados de macrófagos pode estar relacionada com uma resposta fisiológica contrária a algum estresse indevido sobre os mecanismos homeostáticos fisiológicos dos peixes, caracterizando um quadro imunomodulatório.

As análises realizadas nas brânquias se deram somente no momento pré-infecção, pois, havia a necessidade de verificarmos se os tratamentos por banho de imersão causariam algum dano ao órgão. Acreditamos que as lesões observadas nas brânquias não tenham relações com os banhos, pois, invariavelmente, ocorreram em todos os tratamentos. Geralmente, as lesões mais comuns nas brânquias podem ocorrer pela presença de contaminantes na água, bacterioses e parasitos (Eller, 1975).

Kiron (2012), relatou que o intestino está associado ao sistema imunológico dos peixes. A mucosa intestinal é rica em células do sistema imunológico, como linfócitos, plasmócitos, granulócitos eosinofílicos e macrófagos e podem desencadear respostas locais. Brum et al. (2018), observaram em tilápias suplementadas com óleos essenciais de manjeriço e gengibre, diferenças para infiltrado linfocitário entre os grupos, enquanto os parâmetros morfométricos do intestino não apresentaram diferenças. No presente estudo aos 54 dias, também não foi verificada nenhuma diferença na morfometria do intestino entre os peixes nos grupos experimentais.

Por outro lado, após o desafio de infecção experimental, as alterações morfométricas foram mais significativas entre os grupos, com destaque para as células caliciformes. Em nosso estudo, o aumento no

número de células caliciformes, observado entre os grupos no período pós-infecção, pode estar relacionado com a aplicação do biopromotor, uma vez que um número de células caliciformes triplicou em Alim 2. O muco secretado pelas células caliciformes desempenha importantes funções relacionadas à imunidade, serve como barreira mecânica, dificultando a aderência de organismos patogênicos (Subramanian et al., 2007). Alterações na função e na composição do muco das células caliciformes podem estar relacionadas às toxinas de micro-organismos patogênicos ou ativação de respostas imunológicas no organismo. A morte e a perda da mucosa epitelial ocasionam hemorragias e favorecem a adesão de micro-organismos infecciosos (Zachary et al., 2012).

Conforme Amal e Zamri-Saad (2011), a infecção por *Streptococcus* ocasiona muitos sinais clínicos característicos, incluindo sinais mais proeminentes como exoftalmia uni ou bilateral e o abdômen distendido. Os exames post-mortem dos peixes afetados revelaram esplenomegalia e coloração avermelhada do baço, fígado pálido e aumentado. Soto et al. (2016), ao desafiarem tilápias-do-nilo com *S. agalactiae* verificaram que o fígado é um dos órgãos mais afetados por essa bacteriose. Essas informações corroboram com o presente estudo, onde os dados observados na histologia do fígado e baço após a infecção mostram que o agravamento das lesões nesses órgãos foi predominante. Entretanto, vimos que os grupos que foram tratados com o biopromotor apresentaram menores intensidades de lesões em mais de 90% dos casos onde ocorreram as diferenças estatísticas significativas.

Igualmente Brum et al. (2018), ao desafiarem tilápias nilóticas suplementadas com óleos essenciais de gengibre e manjeriço com o patógeno *S. agalactiae*, observaram que a severidade e significância das lesões entre os grupos foi mais frequente e que os peixes tratados com 0,5% de gengibre e 0,5% de manjeriço apresentaram redução significativa de microesteatose, enquanto a intensidade de necrose foi significativamente reduzida nos peixes alimentados com manjeriço a 1,5%, comparado ao controle. No presente estudo verificamos que a necrose foi reduzida e a microesteatose agravou-se de maneira severíssima após o desafio experimental. Segundo Chen et al. (2007), a microesteatose pode ser verificada com frequência no fígado de peixes oriundos da aquicultura e não é necessariamente uma lesão causada por infecção, mas por inadequações na formulação de dietas comerciais. Por outro lado, Zachary et al. (2012), relatam que o fígado é responsável pela degradação metabólica de triglicérides, sendo assim, a microesteatose provavelmente pode ter aumentado severamente devido a falência das funções hepáticas causada pelo quadro infeccioso do desafio

experimental, ocasionando o acúmulo de lipídios no tecido hepático, impedindo a liberação dos mesmos na forma de lipoproteínas.

O período pós-infecção agravou o quadro de lesões no baço dos animais. Yunis-Aguinaga et al. (2015), quando utilizaram unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) na dieta de tilápias-do-nilo desafiadas com *Streptococcus agalactiae* verificaram um incremento da atividade imunológica nos animais e observaram a congestão de vasos no baço, atribuindo o fato ao aumento da atividade desse órgão para fornecer anticorpos e imunoglobulinas. No presente estudo a congestão de vasos no baço foi incidente e intensa em todos os grupos, entretanto os grupos tratados apresentaram maior congestão. Isso nos leva a crer que esses animais estavam com atividade imunitária aumentada devido ao biopromotor.

As análises de atividades enzimáticas foram realizadas somente com as amostras do tecido do fígado dos peixes coletadas no 54º dia do experimento. Um estado moderado de estresse oxidativo induzido por múltiplos agentes estressores pode criar respostas adaptativas e melhorar a capacidade de adaptação aos desafios estressantes (Surai, 2015). Os peixes, diferentemente dos vertebrados terrestres, estão constantemente expostos a EROs devido às condições do ambiente aquático (Chow, 1991), mesmo que as condições sejam controladas, o ambiente de experimentação pode apresentar variações pontuais na temperatura, oxigênio dissolvido, amônia pH, iluminação e além do estresse de cativeiro. As espécies reativas de oxigênio não só induzem as lesões no fígado como também podem prejudicar o sistema de defesa no órgão. A superóxido dismutase e catalase bloqueiam os efeitos oxidativos de EROs (Zachary et al., 2012). Nos peixes, o tecido de órgãos como o fígado, são dotados de sistemas de defesa antioxidante constituídos por CAT e SOD (Basha; Rani, 2003). Atli et al. (2006), verificaram a atividade enzimática catalase em tecidos de órgãos de *O. niloticus* expostas a metais pesados e no fígado observaram aumento de 183% na atividade de CAT. Em humanos, Beaman et al. (1985), verificaram que a catalase pode desempenhar um papel determinante sobre a patogenicidade da bactéria *Nocardia* spp., podendo elevar a resistência dos neutrófilos diante das atividades microbicidas.

No presente estudo a atividade de catalase foi mais elevada nos tratamentos IntraVet e IntraCom, onde os animais desses grupos receberam as doses do biopromotor pela via intraperitoneal. O método de injeção intraperitoneal continua a ser o método mais popular de escolha na vacinação de peixes e na maioria dos estudos, injetar a vacina em peixes resultaram nos melhores resultados (Caipang et al., 2014), o nível

e a duração da eficácia são maiores, gerando um maior estresse ao peixe devido a sua capacidade de depositar antígenos no local da injeção, mantendo, portanto, a base de contato entre antígenos vacinais e células imunológicas para fortalecer e estimular respostas pró-inflamatórias e humorais (Brudeseth et al., 2013). Sendo assim, no presente estudo, a atividade elevada da enzima catalase no tecido hepático dos peixes tratados nos fazem acreditar que, possivelmente, esses animais estavam com suas capacidades imunofisiológicas aumentadas em respostas ao biopromotor administrado via intraperitoneal, uma vez que a atividade da catalase entre os peixes dos grupos IntraVet e IntraCom foi igual.

A cepa S13 (*S. agalactiae*) isolada em um surto de fazenda de tilápia por Facimoto et al. (2017), se mostrou como um agente muito patogênico de alta virulência. Soto et al. (2016), ao desafiarem tilápia-do-nylo com *S. agalactiae* em condições laboratoriais, observaram mortalidades agudas após dois dias, com sinais clássicos de estreptococose e verificaram, ainda, que as via intraperitoneal e intramuscular representaram um método fácil e rápido para administrar com precisão as bactérias suspensas, porém podem ser mais agressivos, pois, as bactérias não são expostas à proteção imune inata presente na pele, nas brânquias e na mucosa gastrointestinal e, portanto, evitam mecanismos importantes de defesa imunológica característica dos peixes.

Pereira et al. (2010), estudaram a virulência de *S. agalactiae* isolada de humanos, bovinos e peixes, usando injeção intraperitoneal e banho de imersão como rotas de infecção em tilápia-do-nylo e verificaram que as cepas analisadas dos três hospedeiros naturais não apresentaram relação genética, mas algumas cepas, bovina e humana, nas dosagens de  $10^7$  UFC peixe<sup>-1</sup> e  $10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> foram capazes de infectar peixes e causar meningoencefalite quando administradas via intraperitoneal. No presente estudo, onde utilizamos a dosagem de  $10^7$  UFC peixe<sup>-1</sup>, foi verificado que *S. agalactiae* foi capaz de infectar e matar 100% dos peixes do grupo controle em até 192 horas após a inoculação do patógeno.

Por outro lado, verificamos que todos os grupos tratados com o biopromotor desenvolveram certa resistência ao patógeno e isso talvez esteja relacionado ao fato do biopromotor conter em sua composição produtos de fermentação de *B. subtilis*, como a bacteriocina subtilina, que é um peptídeo antimicrobiano que pode combater outras estirpes de bactérias gram-positivas (Heinzmann et al., 2006). Além disso, os metabólitos oriundos de *B. subtilis* podem ser usados para melhorar o estado imunológico e de saúde, aumentando a resistência às doenças em *O. niloticus*, melhorando o desempenho do crescimento (Aly et al., 2008). Estes fatos corroboram com todos os indícios encontrados no presente



estudo e que, o desempenho zootécnico alcançado pelos animais dos tratamentos Alim 1 e Alim 2, tenha ligação direta com a via de aplicação do biopromotor, que foi capaz de estimular a mucosa intestinal, ocasionando uma melhora nos mecanismos imunológicos com benefícios diretos sobre a saúde desses animais.

### 3.5 CONCLUSÃO

Uso do biopromotor por meio das vias de administração oral, intraperitoneal e banho de imersão apresentou efeitos significativos em tilápia-do-nylo, proporcionando alterações nos mecanismos hematoimunológicos dos animais, bem como amenizou danos causados pela infecção por *Streptococcus agalactiae*, além de promover certa resistência aos peixes frente ao patógeno.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por bolsa de pesquisa e apoio financeiro a J.L.P. Mouriño (CNPq 308292 / 2014-6) e M.L. Martins (CNPq 446072/2014-1, 305869/2014-0); Departamento de Aquicultura da Universidade Federal e Santa Catarina; Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI, UFSC) e Epagri – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina pela doação dos peixes.

### REFERÊNCIAS ARTIGO 2

- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press.
- Ahmadi, K., Banaee, M., Vosoghei, A. R., Mirvaghefi, A. R., & Ataimehr, B. (2012). Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (actinopterygii: salmoniformes: salmonidae). *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, 42(2).
- Alsaid, M., Abuseliana, A. F., Daud, H. H., Mustapha, N. M., Bejo, S. K., Abdelhadi, Y. M., & Hamdan, R. H. (2014). Haematological, biochemical and clinical signs changes following experimental infection of *Streptococcus agalactiae* in red hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquacultura Indonesiana*, 15(2).

- Aly, S. M., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A., & Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1-2), 128-136.
- Amal, M. N. A., & Zamri-Saad, M. (2011). Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. *Pertanika J Trop Agric Sci*, 34(2), 195-206.
- Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., & Watanabe, T. (2000). Effects of dietary  $\beta$ -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science*, 66(6), 1068-1075.
- Anderson, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 281-307.
- Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S., & Canli, M. (2006). Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2), 218-224.
- Basha, P. S., & Rani, A. U. (2003). Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(2), 218-221.
- Beaman, B. L., Black, C. M., Doughty, F., & Beaman, L. (1985). Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infection and Immunity*, 47(1), 135-141.
- Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., ... & Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1759-1768.
- Brum, A., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mourião, J. L. P., & Martins, M. L. (2017). Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468, 235-243.

Brum, A., Cardoso, L., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., & Martins, M. L. (2018). Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*.

Brum, A., Pereira, S. A., Cardoso, L., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., & Martins, M. L. (2018). Blood biochemical parameters and melanomacrophage centers in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger. *Fish & Shellfish Immunology*.

Caipang, C. M. A., Jomer, B. L., & Clara, L. M. (2014). Updates on the vaccination against bacterial diseases in tilapia, *Oreochromis* spp. and Asian seabass, *Lates calcarifer*. *AAFL Bioflux*, 7(3), 184-193.

Cao, L., Du, J., Ding, W., Jia, R., Liu, Y., Xu, P., ... & Yin, G. (2016). Hepatoprotective and antioxidant effects of dietary *Angelica sinensis* extract against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Research*, 47(6), 1852-1863.

Carbone, D., & Faggio, C. (2016). Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 172-178.

Chen, C., Chao, C., & Bowser, P. R. (2007). Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*-infected tilapia. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 27(1), 2.

Chow, C. K. (1991). Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(2), 215-232.

Collier, H. B. (1944). Standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, 50(6), 550.

Eller, L. L. (1975). Gill lesions in freshwater teleosts. *The Pathology of Fishes*, 305-330.

Embregts, C. W., & Forlenza, M. (2016). Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 118-137.

Facimoto, C. T., Chideroli, R. T., Gonçalves, D. D., do Carmo, A. O., Kalaphotakis, E., & de Pádua Pereira, U. (2017). Whole-Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* Strain S13, Isolated from a Fish Eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. *Genome Announcements*, 5(35), e00917-17.

Fishelson, L. (2006). Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology*, 267(1), 57-69.

Fu, C., Cui, Y., Hung, S. S. O., & Zhu, Z. (1998). Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *Journal of Fish Biology*, 53(1), 115-129.

Gourbeyre, P., Denery, S., & Bodinier, M. (2011). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(5), 685-695.

Gudding, R., Lillehaug, A., & Evensen, Ø. (1999). Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(1-2), 203-212.

Heinzmann, S., Entian, K. D., & Stein, T. (2006). Engineering *Bacillus subtilis* ATCC 6633 for improved production of the lantibiotic subtilin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(5), 532-536.

Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., (2008). Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Arch. Vet. Sci.* 13, 54-63.

Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183-6188.

Kiron, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 111-133.

- Kowalska, A., Zakęś, Z., Jankowska, B., & Siwicki, A. (2011). Substituting vegetable oil for fish oil in pikeperch diets: the impact on growth, internal organ histology, blood biochemical parameters, and proximate composition. *Aquaculture nutrition*, 17(2).
- Li, J., Ma, S., & Woo, N. (2015). Vaccination of Silver Sea Bream (*Sparus sarba*) against *Vibrio alginolyticus*: protective evaluation of different vaccinating modalities. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 40.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137-151.
- Maji, U. J., Mohanty, S., Pradhan, A., & Maiti, N. K. (2017). Immune modulation, disease resistance and growth performance of Indian farmed carp, *Labeo rohita* (Hamilton), in response to dietary consortium of putative lactic acid bacteria. *Aquaculture International*, 25(4), 1391-1407.
- Martins, M. L., Mouriño, J. L. P., Amaral, G. V., Vieira, F. N., Dotta, G., Jatobá, A. M. B., ... & Buglione-Neto, C. C. (2008). Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology*, 68(3), 657-661.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Melo, D.C., Oliveira, D.A.A., Melo, M.M., Junior, D.V., Teixeira, E.A., Guimarães, S.R., (2009). Proteic electrophoretic profile of chitralada tilapia nilotic (*Oreochromis niloticus*), exposed to hypoxia chronic stress. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61 (5), 1183–1190.
- Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 136(1-2), 180-183.
- MSD Animal Health, (2012). Technical Bulletin: *Streptococcus* in the Tilapia Environment. [http://aqua.merckanimalhealth.com/binaries/AquaVac\\_StreSa\\_tech01\\_0Nov12\\_050STREP\\_tcm56-35564.pdf](http://aqua.merckanimalhealth.com/binaries/AquaVac_StreSa_tech01_0Nov12_050STREP_tcm56-35564.pdf) (access in: 20.04.2017).

Owatari, M. S., Jesus, G. F. A., De Melo Filho M. E. S., Lapa, K. R., Martins, M. L., Mouriño, J. L. P. (2018). Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquacultural Engineering*. doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.001

Pereira, U. P., Mian, G. F., Oliveira, I. C. M., Benchetrit, L. C., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2010). Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 140(1-2), 186-192.

Pereira, U. P., Santos, A. R., Hassan, S. S., Aburjaile, F. F., Soares, S. C., Ramos, R. T. J., ... & Barbosa, M. S. (2013). Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain SA20-06, a fish pathogen associated to meningoencephalitis outbreaks. *Standards in Genomic Sciences*, 8(2), 188.

Pohlenz, C., & Gatlin III, D. M. (2014). Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, 431, 111-117.

Popma, T. J., & Lovshin, L. L. (1996). Worldwide prospects for commercial production of tilapia. *International Center for Aquaculture and Aquatic Environments*.

Pretto-Giordano, L. G., Müller, E. E., Klesius, P., & Da Silva, V. G. (2010). Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. *Aquaculture Research*, 41(10), 1539-1544.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Eiras, A. C. D., & Silveira, V. R. D. (2004). 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*, 47(6), 945-953.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos Para Análise Hematológica em Peixes. Eduem, Maringá (140 pp.)

Sankaran, K.; Gurnani, S. Variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, v. 9, p. 162, 1972.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W., & Triebkorn, R. (1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)*, 6(1), 75-86.

Shakya, S. R. (2015). Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) improves growth and enhances immunity in aquaculture. *International Journal of Chemical Studies*, 3(2), 83-87.

Silva, B. C., Martins, M. L., Jatobá, A., Buglione Neto, C. C., Vieira, F. N., Pereira, G. V., ... & Mouriño, J. L. P. (2009). Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(11), 874-880.

Soto, E., Zayas, M., Tobar, J., Illanes, O., Yount, S., Francis, S., & Dennis, M. M. (2016). Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. *Journal of Comparative Pathology*, 155(4), 339-345.

Subramanian, S., MacKinnon, S. L., & Ross, N. W. (2007). A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(3), 256-263.

Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature Immunology*, 14(4), 320.

Surai, P. F. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204-247.

Swain, P., Sahoo, P. K., & Ayyappan, S. (Eds.). (2006). *Fish and Shellfish Immunology: an introduction*. Narendra Pub. House.

Tavares-Dias, M., & Moraes, F. R. D. (2007). Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(1), 49-54.

Telli, G. S., Ranzani-Paiva, M. J. T., de Carla Dias, D., Sussel, F. R., Ishikawa, C. M., & Tachibana, L. (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 305-311.

Tort, L., Balasch, J. C., & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, 22(3), 277-286.

Yi, T., Li, Y. W., Liu, L., Xiao, X. X., & Li, A. X. (2014). Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and  $\alpha$ -enolase. *Aquaculture*, 428, 35-40.

Yılmaz, S., Ergün, S., & Soytaş, N. (2013). Dietary supplementation of cumin (*Cuminum cyminum*) preventing streptococcal disease during first-feeding of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of BioScience & Biotechnology*, 2(2).

Yunis-Aguinaga, J., Claudiano, G. S., Marcusso, P. F., Manrique, W. G., de Moraes, J. R. E., de Moraes, F. R., & Fernandes, J. B. (2015). *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 47(1), 630-638.

Warr, G. W. (1995). The immunoglobulin genes of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 19(1), 1-12.

Wintrobe, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, Frankfurt, v. 51, p. 32-49, 1934.

Wolke, R. E., Murchelano, R. A., Dickstein, C. D., & George, C. J. (1985). Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(1), 222-227.

Zachary, J. F., McGavin, D., & McGavin, M. D. (2012). *Bases da Patologia em Veterinária*. Elsevier Brasil.



#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo demonstrou pela primeira vez os resultados dos efeitos da suplementação de 0,1% de silimarina em dietas para *Oreochromis niloticus*. A administração da silimarina como aditivo alimentar desenvolveu efeitos hepatoprotetores nos peixes, como menor dilatação sinusoidal, infiltrados eosinofílicos e linfocitários no fígado bem como aumento do número de trombócitos sanguíneos. Já o uso do biopromotor por meio das vias de administração oral, intraperitoneal e banho de imersão apresentou efeitos significativos em tilápia-do-nylo, proporcionando alterações nos mecanismos hematoimunológicos dos animais, bem como amenizou danos causados pela infecção por *Streptococcus agalactiae*, além de promover certa resistência aos peixes frente ao patógeno. Portanto, foi possível estabelecer novas estratégias para manutenção sanitária da tilápia-do-nylo (*oreochromis niloticus* L.) promovendo, além do aumento da resistência contra *streptococcus agalactiae*, proteção hepática durante o cultivo.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A incorporação do produto Di-Heptarine S® à dieta na proporção de 0,1% (1 kg/tonelada) mostrou-se eficaz na manutenção sanitária da tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), pois, promoveu proteção hepática e aumento de atividade imunológica em juvenis de tilápia. Por serem estes, os primeiros resultados reportados envolvendo os efeitos hepatoprotetores da silimarina em tilápia-do-nylo, acreditamos que mais estudos devam ser realizados para maiores investigações, incluindo diferentes teores de silimarina à ração, por exemplo.

Em relação ao Gamaxine®, verificamos que o mesmo foi capaz de amplificar os parâmetros hematoimunológico em tilápias-do-nylo, comprovando que o sistema imunológico dos peixes é muito similar ao encontrado em vertebrados superiores, uma vez que, o produto foi desenvolvido para aves. No estudo, o estabelecimento do grupo controle positivo, onde os peixes foram imunizados com a vacina comercial Aquavac, foi fundamental, pois, desta maneira um padrão de animais imunomodulados e imunoestimulados foi determinado, proporcionando uma modelagem excelente para comparação. No presente estudo verificamos que as lesões histológicas podem ser induzidas por doenças, por fatores ambientais ou nutricionais. Entretanto as análises histológicas mostraram que houve menor intensidade de lesões nos peixes que receberam a aplicação do biopromotor.

Os indicadores hematológicos, imunológicos, histológicos e enzimáticos obtidos no presente estudo nos forneceram informações sólidas acerca do sistema imune de tilápias nas condições experimentais propostas, e que o mesmo é constituído por um mecanismo de proteção altamente complexo que dispõe de uma ampla gama de recursos e componentes individuais. Assim, podemos afirmar que as melhorias observadas nos peixes que passaram pelos tratamentos são indícios fortes de um efeito imunomodulador nos animais. Todavia, em pesquisas futuras acerca do biopromotor Gamaxine®, seriam necessárias maiores investigações para dose intraperitoneal com volume inferior a 200 µL peixe-1 e tratamento de imersão com tempo de banho abaixo de 20 minutos.



## REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

AHMADI, K. et al. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (actinopterygii: salmoniformes: salmonidae). **Acta Ichthyologica Et Piscatoria**, v. 42, n. 2, 2012.

AMAL, Mohammad Noor Azmai et al. Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review. **Pertanika Jorunal Tropical Agriculture Science**, v. 34, n. 2, p. 195-206, 2011.

ANDERSON, Douglas P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 281-307, 1992.

BLAZER, Vicki S. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 309-323, 1992.

BRUDESETH, Bjørn Erik et al. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1759-1768, 2013.

BRUM, Aline et al. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 468, p. 235-243, 2017.

CAIPANG, Christopher Marlowe A.; JOMER, B. L.; CLARA, Ly M. Updates on the vaccination against bacterial diseases in tilapia, *Oreochromis* spp. and Asian seabass, *Lates calcarifer*. **AAFL Bioflux**, v. 7, n. 3, p. 184-193, 2014.

EMBREGTS, Carmen WE; FORLENZA, Maria. Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 64, p. 118-137, 2016.

EPAGRI - **Desempenho da piscicultura de água doce**. Disponível em: <[http://www.epagri.sc.gov.br/?page\\_id=676](http://www.epagri.sc.gov.br/?page_id=676)> Acesso em: 14 nov. 2016.

FAO. 2018. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018** - Meeting the sustainable development goals. Rome.

FACIMOTO, César T. et al. Whole-Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* Strain S13, Isolated from a Fish Eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. **Genome Announcements**, v. 5, n. 35, p. e00917-17, 2017.

FLORA, Kenneth et al. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93, n. 2, p. 139, 1998.

GUDDING, R.; LILLEHAUG, A.; EVENSEN, Ø. Recent developments in fish vaccinology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, n. 1, p. 203-212, 1999.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, v. 43, 2015. Disponível em: < [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2015\\_v43\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf) >. Acesso em: 23 junho 2017.

JACOBS, Bradly P. et al. Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 6, p. 506-515, 2002.

JATOBÁ, A. et al. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008.

KARKANIS, Anestis; BILALIS, Dimitrios; EFTHIMIADOU, Aspasia. Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 825-830, 2011.

KAYANSAMRUJ, Pattanapon et al. Increasing of temperature induces pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* and the up-regulation of inflammatory related genes in infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1, p. 265-271, 2014.

KIRON, Viswanath. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 111-133, 2012.

KOWALSKA, A. et al. Substituting vegetable oil for fish oil in pikeperch diets: the impact on growth, internal organ histology, blood biochemical

parameters, and proximate composition. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 2, 2011.

LANDOLT, Marsha L. The relationship between diet and the immune response of fish. **Aquaculture**, v. 79, n. 1-4, p. 193-206, 1989.

LI, J.; MA, S.; WOO, N. Vaccination of Silver Sea Bream (*Sparus sarba*) against *Vibrio alginolyticus*: Protective evaluation of different vaccinating modalities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 40, 2015.

LIU, Guangjin et al. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 122, n. 2, p. 163-170, 2016.

LOCHMILLER, Robert L.; DEERENBERG, Charlotte. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? **Oikos**, v. 88, n. 1, p. 87-98, 2000.

MAGNADÓTTIR, Bergljót. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.

MARCUSSO, Paulo Fernandes et al. Influence of temperature on *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, (52), v. 1, p. 57-62, 2015.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P. et al. (eds.) **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004.

MSD Animal Health, 2012. **Technical Bulletin: Streptococcus in the Tilapia Environment**. [http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/AquaVac\\_StreSa\\_tech01\\_0Nov12\\_050STREP\\_tcm56-35564.pdf](http://aqua.merck-animal-health.com/binaries/AquaVac_StreSa_tech01_0Nov12_050STREP_tcm56-35564.pdf) (acessado 20.04.2017).

OWATARI, M. S. et al. Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). **Aquacultural Engineering**, 2018. doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.001

PEREIRA, U. P. et al. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain SA20-06, a fish pathogen associated to meningoencephalitis outbreaks. **Standards in Genomic Sciences**, v. 8, n. 2, p. 188, 2013.

POHLENZ, Camilo; GATLIN, Delbert M. Interrelationships between fish nutrition and health. **Aquaculture**, v. 431, p. 111-117, 2014.

PRETTO-GIORDANO, L. G. et al. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 10, p. 1539-1544, 2010.

SEALEY, Wendy M.; GATLIN III, Delbert M. Overview of nutritional strategies affecting health of marine fish. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 2, p. 11-26, 1999.

SHAKYA, Shubha Ratna. Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) improves growth and enhances immunity in aquaculture. **International Journal of Chemical Studies**, v. 3, n. 2, p. 83-87, 2015.

SINGH, Siddhartha et al. Combinational Effect of *Cajanus cajan*, *Silybum marianum* and *Andrographis paniculata* on in vivo Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Carbon Tetrachloride Intoxicated Albino Rats. **Annual Research and Review in Biology**, v. 4, n. 4, p. 665-674, 2014.

SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary**, v. 67, p. 117-124, 2005.

SUNYER, J. Oriol. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. **Nature Immunology**, v. 14, n. 4, p. 320-326, 2013.

TAVARES-DIAS, Marcos; MARTINS, Maurício Laterça. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, p. 1-6, 2017.



TORT, L.; BALASCH, J. C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Immunología**, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2003.

VIDAL, Luiz Vítor Oliveira et al. Eugenol as an anesthetic for Nile tilapia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

XIAO, Peizhen et al. Dietary silymarin supplementation promotes growth performance and improves lipid metabolism and health status in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed diets with elevated lipid levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 245-263, 2017.

YI, T. et al. Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and  $\alpha$ -enolase. **Aquaculture**, v. 428, p. 35-40, 2014.

YILMAZ, S.; ERGÜN, S.; SOYTAŞ, N. Dietary supplementation of cumin (*Cuminum cyminum*) preventing streptococcal disease during first-feeding of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Journal of BioScience and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 117-124, 2013.

WARR, Gregory W. The immunoglobulin genes of fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 1995.

WU, Ying-ruì et al. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p. 220-227, 2013.

ZAGMUTT, Francisco J.; SEMPIER, Stephen H.; HANSON, Terril R. Disease Spread Models to Estimate Highly Uncertain Emerging Diseases Losses for Animal Agriculture Insurance Policies: An Application to the US Farm-Raised Catfish Industry. **Risk Analysis**, v. 33, n. 10, p. 1924-1937, 2013.

ZAKĘŚ, Zdzisław et al. Impact of diets supplemented with rapeseed, soy, and sunflower oils on growth rates and the histological picture of

the livers of juvenile pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). **Archives of Polish Fisheries**, v. 18, n. 2, p. 67-75, 2010.