



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

LARISSA ANDRÉIA FERREIRA SAMPAIO

PAPEL DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DO INTESTINO DE
Colossoma macropomum **NA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE**

SANTARÉM – PA

2024

LARISSA ANDRÉIA FERREIRA SAMPAIO

PAPEL DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DO INTESTINO DE
Colossoma macropomum **NA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador (a): Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano

Co-orientador (a): Profa. Dra. Michelle Midori Sena Fugimura

SANTARÉM – PA


2024

LARISSA ANDRÉIA FERREIRA SAMPAIO


**PAPEL DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DO INTESTINO DE
Colossoma macropomum NA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre.


Data de Aprovação: 10/05/2024

Documento assinado digitalmente
 **GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO**
Data: 30/05/2024 14:41:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Gustavo da Silva Claudiano - Orientador (a)
Instituto de Biodiversidade e Florestas (IBEF-UFOPA)

Documento assinado digitalmente
 **GRACIENE DO SOCORRO TAVEIRA FERNANDES**
Data: 29/05/2024 20:42:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Graciene do Socorro Taveira Fernandes
Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA-UFOPA)

Documento assinado digitalmente
 **CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO**
Data: 06/06/2024 07:00:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)

Documento assinado digitalmente
 **PAULO FERNANDES MARCUSO**
Data: 29/05/2024 16:42:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Paulo Fernandes Marcusso
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

S192p Sampaio, Larissa Andréia Ferreira
Papel da adição de bactérias autóctones do intestino de *Collossoma macropomum* na fisiopatologia da sepse / Larissa Andréia Ferreira Sampaio. – Santarém, 2024.
63 p.
Inclui bibliografias.

Orientação: Gustavo da Silva Claudiano; Coorientação: Michelle Midori Sena Fugimura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. Probióticos. 2. Aquicultura. 3. Peixe. 4. Psicultura. I. Claudiano, Gustavo da Silva, *orient.* II. Fugimura, Michelle Midori Sena, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 639.31

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que moldou todo o trajeto para que eu chegasse até aqui e me concedeu forças e determinação para continuar trilhando.

Agradeço à minha mãe Patrícia e às minhas irmãs Laísa, Raíssa e Valentina por estarem sempre presentes, fornecendo acima de tudo, encorajamento e apoio emocional. Vocês nunca duvidaram de mim, outrora eu mesma tivesse chegado a duvidar. Às minhas avós: Cândida, Maria e Onildes por todo o amor e conforto e ao meu pai, Jonisson.

Agradeço aos meus “filhos” pets Arwen, Wangji e Nala e aos meus “irmãos” Athena e Simba (Kiki) pelo aconchego, conforto, por permitirem equilibrar minha sanidade mental e, principalmente, por todo seu amor. Um agradecimento à Melzinha (*in memorian*) e aos demais gatos da UFOPA por me trazerem alegria diariamente ao frequentar o campus. Sentirei muita saudade de vocês, mas os mantereí sempre comigo aonde quer que eu vá e continuarei rezando pelo seu bem-estar e segurança.

Aos meus amigos, em especial à Victória, por ter sido fonte de encorajamento ao longo de todo este trajeto. Você me fez perceber o quão é importante termos um amigo que zele pelo significado da palavra. Além de amiga, você é minha irmã, minha alma gêmea. Obrigada por sempre cuidar de mim. Agradeço também à tia Zefinha e à toda a família da Vic por sempre me receberem tão bem em São Paulo.

Aos integrantes do GESAQUI, em especial às minhas maravilhosas mulheres da ciência: Layana, Laine, Andrya, Aline, Kárita, Vivian e Grazi por todo o companheirismo e auxílio. Embora sigamos caminhos diferentes, sou muito grata pela oportunidade em termos caminhado juntas por um período.

Agradeço ao Gilson pelo suporte técnico e ao Prof. Dr. Humberto pela disponibilidade em realizar os experimentos no LARSANA, que têm sido minha segunda casa nos últimos dois anos. Agradeço também a toda a equipe do LAMPOA: Prof. Dr. Luciano, Jonny, Wander, Laura, Rosalba, Neto, Marcos, à maravilhosa Gleika e aos demais que também contribuíram nos longos períodos de suplementação. Eu jamais teria conseguido cumprir essa tarefa sem sua ajuda.

Agradeço à minha coorientadora Profa. Dra. Michelle por todo o suporte fornecido ao longo do desenvolvimento deste trabalho, especialmente durante a fase

inicial. Obrigada por ser sempre tão solícita. Saiba que é uma das mulheres dentro da ciência que mais admiro e que tenho como um modelo a ser seguido.

Um agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo por compartilhar comigo seus conhecimentos e acreditar no meu potencial. Acima de professor e orientador, você sempre foi um grande amigo. Tenho muito orgulho em ter sido sua orientanda. Muito obrigada também por todas as oportunidades oferecidas. Tenha a certeza de que contribuiu enormemente para meu crescimento profissional. Ouso dizer pessoal também, pois pessoas como você agregam em nossa vida.

À Profa. Dra. Cleni, ao Luiz e à toda a equipe do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP pelo suporte fornecido nas análises realizadas.

Também agradeço ao Prof. Dr. Paulo Marcusso e às suas “filhas” Vilma e Dilma por terem me recebido tão bem em Botucatu. À Adriana e ao Márcio pela paciência e suporte nas análises realizadas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP/Botucatu).

Todas as pessoas aqui citadas tiveram uma participação fundamental direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho. Nenhuma pessoa cresce sozinha, e vocês contribuíram significativamente para meu contínuo crescimento.

Por fim, agradeço à banca pelo aceite e contribuição com este trabalho.

“Quando meus pequenos passos se acumularem, um dia formarão um caminho firme.”

— *Woozi*

RESUMO

A aeromonose é uma doença que causa septicemia hemorrágica e acomete frequentemente os peixes em sistemas de criação, resultando em altas mortalidades. Sabe-se que o intestino desempenha um papel importante no sistema imunológico e a composição de seu microbioma é afetada em indivíduos sépticos. Assim, a correção da disbiose pode ser uma estratégia para amenizar o agravo do processo séptico. Dessa forma, o trabalho objetivou analisar os efeitos na imunofisiologia e na microbiota em tambaquis, *Colossoma macropomum*, suplementados com cepas de bactérias probióticas autóctones durante a sepse induzida por *Aeromonas hydrophila*. As cepas probióticas foram isoladas em ensaios prévios do intestino (I10) e de um mix de intestino e fezes (M14) de tambaquis oriundos do rio Amazonas. Para o experimento, os peixes receberam ração suplementada com cada cepa probiótica separadamente uma (1) vez (M14 1x e I10 1x) ou 3 vezes ao dia (M14 3x e I10 3x), na concentração 3×10^9 UFC/mL e dose de 15 mL/kg de ração, durante 90 dias e com frequência de alimentação de 3 vezes ao dia para todos os grupos. O grupo controle não recebeu dieta suplementada. Após o período de suplementação, os animais foram desafiados pela inoculação na cavidade celomática com *A. hydrophila* (DL50% $1,78 \times 10^8$) e 24 horas após desafio (HPD), o sangue e o intestino foram coletados para análises hematológicas, bioquímicas, imunidade inata e microbiota intestinal. No período de 24 HPD todos os peixes apresentaram sinais de hemorragia interna, com líquido hemorrágico na cavidade celomática e hemocultura positiva. Na análise do eritrograma não foi verificada diferença ($p > 0,05$) em relação ao controle nas concentrações de hemoglobina (Hb) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Houve redução na contagem de eritrócitos e no volume globular/hematócrito (VG) no grupo controle em relação aos grupos suplementados ($p < 0,05$). Em relação ao volume corpuscular médio (VCM), foi observado redução para os peixes suplementados com a cepa I10 ($p < 0,05$) e redução nos níveis de hemoglobina corpuscular média (HCM) nos grupos suplementados ($p < 0,05$). Observou-se leucopenia e trombocitopenia no grupo controle ($p < 0,05$) em relação aos grupos suplementados. No bioquímico sérico observou-se aumento significativo nos níveis de triglicérides e redução ($p < 0,05$) aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) para todos os grupos suplementados. As variáveis do sistema imune inato apresentaram aumento das concentrações de lisozima nos peixes

suplementados com I10 3x e I10 1x e a MPO mais ativa nos suplementados com M14 1x e I10 1x, sem alteração das ERO. Na aglutinação bacteriana, os grupos que receberam dieta suplementada com a cepa do mix tiveram maiores titulações de anticorpos. A análise metagenômica permitiu identificar maior abundância de espécies bacterianas nos grupos suplementados com probióticos, com destaque para bactérias como *Cetobacterium somerae*, que apresentam efeitos probióticos comprovados, enfatizando a capacidade de M14 e I10 em interagirem com a microbiota benéfica residente dos peixes. Além disso, a aeromonose induziu disbiose com maior presença de bactérias do gênero *Enterobacter* em todos os grupos. Os resultados indicam que as cepas autóctones, principalmente a cepa isolada do mix (M14), provocaram melhoras na resposta imunológica e melhora na disbiose dos tambaquis suplementados.

Palavras-chave: probiótico, aquicultura, imunidade, profilaxia, disbiose.

ABSTRACT

Aeromonosis is a disease that causes hemorrhagic septicemia and frequently affects fish in farming systems, resulting in high mortality. It is known that the intestine plays an important role in the immune system and the composition of its microbiome is affected in septic individuals. Thus, correcting dysbiosis can be a strategy to alleviate the worsening of the septic process. Thus, the work aimed to analyze the effects on immunophysiology and microbiota in tambaquis, *Colossoma macropomum*, supplemented with strains of autochthonous probiotic bacteria during sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. The probiotic strains were isolated in previous tests from the intestine (I10) and from a mix of intestine and feces (M14) of tambaquis from the Amazon River. For the experiment, the fish received feed supplemented with each probiotic strain separately one (1) time (M14 1x and I10 1x) or 3 times a day (M14 3x and I10 3x), at a concentration of 3×10^9 CFU/mL and a dose of 15 mL/kg of feed, for 90 days and with a feeding frequency of 3 times a day for all groups. The control group did not receive a supplemented diet. After the supplementation period, the animals were challenged by inoculating the coelomic cavity with *A. hydrophila* (DL50% 1.78×10^8) and 24 hours after challenge (HPD), blood and intestine were collected for hematological, biochemical, innate immunity analyzes and intestinal microbiota. During the 24 HPD period, all fish showed signs of internal hemorrhage, with hemorrhagic fluid in the coelomic cavity and positive blood culture. In the erythrogram analysis, there was no difference ($p > 0.05$) in relation to the control in hemoglobin concentrations (Hb) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). There was a reduction in erythrocyte count and globular volume/hematocrit (VG) in the control group compared to the supplemented groups ($p < 0.05$). In relation to the mean corpuscular volume (MCV), a reduction was observed for fish supplemented with strain I10 ($p < 0.05$) and a reduction in mean corpuscular hemoglobin (HCM) levels in the supplemented groups ($p < 0.05$). Leukopenia and thrombocytopenia were observed in the control group ($p < 0.05$) compared to the supplemented groups. In serum biochemistry, a significant increase in triglyceride levels and a reduction ($p < 0.05$) in aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were observed for all supplemented groups. The innate immune system variables showed increased lysozyme concentrations in fish supplemented with I10 3x and I10 1x and MPO was more active in those supplemented with M14 1x and I10 1x, without changes in ROS. In bacterial

agglutination, the groups that received a diet supplemented with the mix strain had higher antibody titers. The metagenomic analysis allowed the identification of a greater abundance of bacterial species in the groups supplemented with probiotics, with emphasis on bacteria such as *Cetobacterium somerae*, which have proven probiotic effects, emphasizing the ability of M14 and I10 to interact with the beneficial microbiota resident in the fish. Furthermore, aeromonosis induced dysbiosis with a greater presence of bacteria of the genus *Enterobacter* in all groups. The results indicate that the autochthonous strains, mainly the strain isolated from the mix (M14), caused improvements in the immunological response and improved dysbiosis in the supplemented tambaquis.

Keywords: probiotic, aquaculture, immunity, prophylaxis, dysbiosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Sinais clínicos em <i>Colossoma macropomum</i> desafiados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	37
Figura 2 – Concentração de espécies reativas de oxigênio.....	40
Figura 3 – Curva padrão e concentração de lisozima sérica.....	41
Figura 4 – Atividade da mieloperoxidase.....	41
Figura 5 – Títulos dos anticorpos naturais.....	42
Figura 6 – Abundância dos principais gêneros bacterianos presentes nos grupos amostrais de <i>Colossoma macropomum</i> após 90 dias de suplementação com as cepas probióticas seguido do desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i>	43
Figura 7 – Abundância e diversidade das principais espécies bacterianas presentes nos grupos amostrais de <i>Colossoma macropomum</i> após 90 dias de suplementação com as cepas probióticas seguido do desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i>	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores médios e análise de variância para hemograma em *Colossoma macropomum* suplementados com cepas de bactérias probióticas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*..... 38
- Tabela 2 – Valores médios e análise de variância para variáveis bioquímicas em *Colossoma macropomum* suplementados com cepas de bactérias probióticas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS

ALB	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BAL	Bactérias ácido-lácticas
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl ⁻	Ânion cloreto
CNR	Controle Negativo de Reação
COL	Colesterol
DL	Dose letal
DMF	N,N-dimetilformamida
DO	Densidade óptica
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid / Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Ert	Eritrócito
FA	Fosfatase alcalin
G.L.	Gay-Lussac / Grau Lussac
GLIC	Glicose
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HOBr	Ácido hipobromoso
HOCl	Ácido hipocloroso
HOSCN	Ácido hipotiocianoso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ITS	Internal Transcribed Spacer / Espaçador Transrito Interno
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucócitos totais
MPO	Mieloperoxidase

MRS	Man, Rogosa & Sharpe
NBT	Nitroblue tetrazolium
PB	Proteína bruta
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMA	Forbol-12-Miristato-13-Acetato
PT	Proteínas totais
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido rinobucleico ribossômico
TMB	Tetrametilbenzidina
TRIG	Trglicerídeos
TSA	Tryptic Soy Agar / Ágar Soja Triptona
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular / Hematócrito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Aeromonose em teleósteos.....	19
3.3 Sistema imunológico em peixes.....	21
3.4 Probióticos na piscicultura.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Obtenção das cepas probióticas.....	26
4.2 Peixes e delineamento experimental.....	27
4.3 Preparo dos inóculos bacterianos e dieta experimental.....	28
4.4 Obtenção da bactéria patogênica.....	28
4.5 Determinação da DL50% (50-96h)	29
4.6 Indução da sepse.....	29
4.7 Variáveis clínicas laboratoriais.....	30
4.7.1 Hemocultura e sinais clínicos.....	30
4.7.2 Hemograma.....	31
4.7.3 Perfil bioquímico sérico.....	31
4.8 Análise da imunidade inata.....	32
4.8.1 Produção de espécies reativas de oxigênio em leucócitos no sangue.....	32
4.8.2 Determinação da concentração de lisozima sérica.....	32
4.8.3 Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	33
4.8.4 Atividade de aglutinação bacteriana.....	34
4.9 Análise metagenômica.....	34
4.10 Análise Estatística.....	36
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Variáveis clínicas laboratoriais.....	36
5.1.1 Hemocultura e sinais clínicos.....	36
5.1.2 Hemograma.....	37
5.2.3 Perfil bioquímico sérico.....	38

5.2 Análise da imunidade inata.....	39
5.2.1 Produção de espécies reativas de oxigênio em leucócitos no sangue.....	39
5.2.2 Determinação da concentração de lisozima sérica.....	40
5.2.3 Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	41
5.2.4 Atividade de aglutinação bacteriana.....	42
5.3 Análise metagenômica.....	42
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÕES.....	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura vem se destacando como um importante setor da produção animal nos últimos anos, atuando de forma relevante na produção mundial de alimentos e contribuindo para a geração de emprego e renda. Além disso, é uma atividade alternativa à pesca, reduzindo desta forma a sobrepesca de animais selvagens (ZORRIEHZAHRA et al., 2016; LIMA et al., 2018; ALONSO et al., 2019). Dentre as espécies com grande potencialidade de expansão de produção, destaca-se o tambaqui, *Colossoma macropomum*, em virtude de apresentar inúmeras características vantajosas como fácil adaptação aos alimentos formulados, tolerância a valores críticos de oxigênio dissolvido, elevado desempenho produtivo, fácil manejo, bom rendimento de carcaça (45%) e grande demanda do mercado por apresentar uma carne bastante apreciada e com alto valor nutricional (MENDONÇA et al., 2012; SILVA e FUJIMOTO, 2015).

A crescente demanda por produtos com elevado valor nutritivo, como os preparados a base de pescado, implica na intensificação dos sistemas de criação (GHOMRASSI et al., 2016). Este fator, além de aumentar o risco de impactos ambientais, como alterações na qualidade da água dos ambientes naturais, pode também gerar estresse nos animais levando à disseminação de doenças (PRIDGEON e KLESIUS, 2012).

Uma das doenças mais comuns em peixes na produção aquícola é a aeromonose, provocada por bactérias do gênero *Aeromonas* sp. e responsável por grande perda de produção (MARINHO-NETO, 2019). Este microrganismo está presente naturalmente na água de criação e na microbiota normal dos peixes. Porém, alterações ambientais bruscas, má qualidade da água e nutrição inadequada podem ser fatores cruciais para a multiplicação dessas bactérias que afetam consideravelmente o sistema imunológico dos animais. Como consequência, pode ocorrer o chamado processo séptico em função da resposta exagerada do organismo em contato com microrganismos invasores, resultando no comprometimento de muitos órgãos e podendo levar a altas mortalidades de peixes na produção (PÁDUA et al., 2010; NDUKA e PARRILLO, 2011; SINGER et al., 2016).

Na tentativa de controlar a incidência dessa e de outras doenças, os produtores geralmente utilizam antibióticos na água de criação devido a sua rápida ação e ampla disponibilidade (RINGO et al., 2020; PEREIRA et al., 2020). Entretanto, o emprego

incorreto desses compostos químicos pode ser prejudicial aos animais uma vez que resíduos permanecem em seu organismo, induzindo a disbiose e afetando a nutrição, fisiologia e imunidade dos animais (LIU et al., 2015; RINGO et al., 2020). Além disso, o uso prolongado pode desencadear uma pressão seletiva de bactérias multirresistentes, tornando-se um problema de saúde pública (BANERJEE et al. 2017; XUE et al., 2020).

Assim, os probióticos surgem como alternativas promissoras aos antibióticos pois inibem o crescimento de microrganismos patogênicos, sem provocar prejuízos à saúde do animal (AKHTER et al., 2015). Trata-se de microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas e, no caso dos peixes, podem ser administrados através da dieta ou água de criação (TACHIBANA et al., 2019). Os probióticos agem na modulação do sistema imunológico, atuando na maturação do tecido linfóide associado ao intestino, órgão que representa importante papel contra infecção associada a patógenos (YAMASHITA et al., 2017; RUIZ et al., 2019). Em virtude disso, estudos relacionados com a utilização de probióticos na aquicultura têm sido amplamente realizados, visando a obtenção de uma produção aquícola mais eficiente e sustentável (GENG et al., 2012; REIS NETO, 2012; AZEVEDO et al., 2016; SILVA et al., 2021; BARROS et al., 2022). Dentre os microrganismos potencialmente estudados como aditivo probiótico na aquicultura estão as bactérias ácido-lácticas, especialmente as pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sp., demonstrando seu potencial inibitório em relação a patógenos e auxiliando na imunoestimulação do organismo (VIEIRA et al., 2013; MERRIFIELD et al., 2014; HAI, 2015; JATOBÁ et al., 2017, PEREIRA et al., 2019).

Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar os efeitos da suplementação com linhagens de bactérias lácticas isoladas da microbiota intestinal de tambaquis saudáveis com potencial probiótico na recria desta mesma espécie. A descrição desses mecanismos ampliará o entendimento da interação patógeno-hospedeiro, que possibilitará a construção de estratégias voltadas para o desenvolvimento de novas linhagens de probióticos, assim como no controle e a profilaxia de doenças graves, como a sepse.

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os aspectos fisiopatológicos em *Colossoma macropomum*, suplementados com probióticos autóctones em diferentes frequências na dieta, durante a resposta séptica induzida por *Aeromonas hydrophila*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar alterações nos parâmetros sanguíneos dos tambaquis suplementados com bactérias lácticas selecionadas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*;
2. Analisar o perfil bioquímico de tambaquis suplementados com cepas probióticas acometidos com aeromonose;
3. Investigar a resposta imune inata (*burst* oxidativo, concentração sérica de lisozima, atividade da mieloperoxidase e aglutinação bacteriana) após o processo séptico induzido por *A. hydrophila*;
4. Avaliar a riqueza, abundância e diversidade da microbiota intestinal em peixes alimentados com as cepas probióticas autóctones;
5. Verificar se houve diferença entre as cepas e frequências de alimentação administradas quanto as alterações clínicas e resposta imune dos tambaquis, após desafio com *A. hydrophila*

2. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aeromonose em teleósteos

O rápido avanço da aquicultura em decorrência da crescente demanda por seus produtos implica em novas tecnologias para a intensificação da criação, principalmente no setor da piscicultura (FERRAREZI, 2021). A produção em alta densidade, por sua vez, pode ser um fator que além de causar impactos ambientais como alterações na qualidade da água, quando mal executada pode gerar ainda estresse nos animais, levando à disseminação de doenças que os acometem de forma severa, causando mortalidades em massa e grandes perdas econômicas (PRIDGEON e KLESIUS, 2012).

As doenças nos peixes em pisciculturas muito comumente ocorrem devido a agentes patogênicos que são encontrados no meio natural de criação e que, devido a

um desequilíbrio no ambiente ou problema de manejo com a produção, passam a ter condições favoráveis à sua replicação e indução à doença (DEFOIRDT, 2013). Dentre estes agentes infecciosos podemos citar as bactérias, dentre as quais as do gênero *Aeromonas*, responsáveis por provocar grandes perdas na produção (FERRAREZI, 2021). São bactérias Gram-negativas, não esporulantes, com respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa, têm forma de bastonete móvel e possuem flagelos polares (STOSKOPF, 1993). Esses microrganismos estão presentes naturalmente no ambiente de criação e fazem parte da microbiota normal de organismos aquáticos saudáveis. Porém, o estresse gerado por alterações na qualidade da água e/ou nas práticas inadequadas de manejo na piscicultura intensiva pode ocasionar surtos infecciosos por essa bactéria (MARINHO-NETO, 2019).

As *Aeromonas* spp. mais virulentas são as pertencentes à espécie *Aeromonas hydrophila* e os principais fatores de virulência estão relacionados à produção de enzimas extracelulares e toxinas associadas aos sinais clínicos de aeromonose, como as proteases, citosinas, elastases, amilases, nucleases, lípases e hemolisinas (RINCÒN et al., 2016). Ademais, por serem Gram-negativas, são constituídas de lipopolissacarídeos (LPS), descritos como potentes agentes quimiotáticos de leucócitos e indutores do choque séptico tanto em mamíferos como em peixes (CAMPOS et al., 2020). De modo geral, são bactérias oportunistas responsáveis por provocar septicemia hemorrágica nos hospedeiros enfraquecidos (AUSTIN, 2012).

Os metabólitos tóxicos de *A. hydrophila* são absorvidos pelo intestino e induzem toxemia no organismo do animal, provocando hemorragias capilares (petéquias), nas dermes das nadadeiras, na superfície do corpo e na submucosa do estômago com degeneração das células hepáticas e do epitélio dos túbulos renais (ETO et al., 2018). A transmissão se dá de modo horizontal na qual o agente infeccioso presente na água ou sedimento de viveiros infecta os peixes no momento de descargas do trato intestinal ou quando há lesões externas na pele. Ocorre com maior frequência em água mais quentes com grande quantidade de matéria orgânica ou fatores estressantes, condições que se encaixam, em geral, nos sistemas de criação em alta densidade (PEIXOTO et al., 2012).

Além disso, o manejo inadequado, oscilações de temperatura e transporte irregular são fatores que contribuem para o aumento na incidência de *Aeromonas* sp. na aquicultura (SILVA et al., 2023). Uma vez que *Aeromonas* sp. é um patógeno

amplamente comum nos ambientes aquáticos e responsável pela alta mortalidade de peixes, quaisquer desregulações nos sistemas de criação podem ocasionar consideráveis perdas econômicas (LEÃO et al., 2020).

Dentro deste contexto, a sepse ou processo séptico refere-se à inflamação exacerbada provocada por um agente patogênico relacionada com o consequente sinal do hospedeiro em relação a este agente agressor, ou seja, trata-se de uma reação inflamatória sistêmica desencadeada frente a uma infecção grave e que provoca disfunção orgânica (SHANKAR-HARI et al., 2016).

O processo séptico é uma condição que se origina do contato do organismo com componentes microbianos que ativam o sistema de defesa, ocorrendo a liberação de mediadores inflamatórios (CARDOSO e BRAGA, 2018). Este processo é desencadeado pela multiplicação e liberação de endotoxinas ou LPS por bactérias Gram-negativas, como a *A. hydrophila*, onde, após a lise das bactérias, ocorre liberação de sua fração denominada lipídeo A, promovendo a grande reação inflamatória conhecida como choque séptico. Este choque, por sua vez, está associado a altas taxas de mortalidade em pequenos animais, em virtude de ser desencadeado a partir de qualquer doença pré-existente, de natureza infecciosa ou não, além de não apresentar sinais e sintomas patognomônicos, dificultando o diagnóstico (TOMÁS, 2012; CANDIDO, 2012; RABELO, 2012).

A inflamação é uma resposta normal do organismo contra agentes infecciosos, porém, no processo séptico há uma ativação excessiva de células inflamatórias que resultam em anarquia metabólica uma vez que as vias pró-inflamatórias aumentam suas atividades para eliminar patógenos e acabam provocando lesões (OLINDA et al., 2014). A principal consequência dessa resposta inflamatória exacerbada e descontrolada é o quadro de choque com evolução para a síndrome da insuficiência de múltiplos órgãos, acompanhada de alta mortalidade (CAMPOS et al., 2020). Desse modo, a sepse pode ser definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica que tem como fator etiológico uma infecção (RABELO, 2012).

3.2 Sistema imunológico em peixes

O sistema imunológico possui um conjunto de componentes que defendem o organismo contra substâncias estranhas e patogênicas sendo, portanto, um importante mecanismo de sobrevivência a todos os animais (ZHU et al., 2012). O

sistema imunológico dos peixes compartilha similaridades com outros vertebrados, com exceção de não apresentarem linfonodos ou medula óssea (ETO et al., 2018). Ao invés, os responsáveis pela imunidade destes animais são os tecidos e órgãos, chamados de linfoides, e constituem os rins, timo, baço e tecidos linfoides associados à mucosa, todos desenvolvidos durante o período larval (BILLER-TAKAHASHI et al., 2014). Nesses órgãos são formados os linfócitos, monócitos, trombócitos e granulócitos, além de eritrócitos (ETO et al., 2018).

O rim cefálico apresenta papel fundamental na hematopoiese, responsável pela formação de várias células como os macrófagos, monócitos e granulócitos (BILLER-TAKAHASHI e URBINATI, 2014). No timo é onde ocorre o desenvolvimento e maturação dos linfócitos T (BOWDEN et al., 2015). Já o baço, é dividido em duas regiões, a polpa branca que está relacionada a formação das células de defesa, e a polpa vermelha responsável pela fagocitose das células anormais ou velhas e está relacionado com a formação de anticorpos (RODRIGUES et al., 2020). Os tecidos linfoides associados a mucosas, que incluem pele e brânquias são responsáveis pela produção de muco que contém importantes proteínas, como a lisozima e proteínas do sistema complemento, atuando como barreira inicial contra os invasores (SILVA, 2021).

Ainda, outras células estão relacionadas com a resposta à resistência patogênica em teleósteos, como as células epiteliais e caliciformes. Dessa forma, a integridade da mucosa está associada diretamente com a renovação celular do epitélio, e o aumento do número de células caliciformes com a boa qualidade da microbiota natural, uma vez que estas células têm papel fundamental na produção de muco (SCHWARZ et al. 2010). O muco produzido impede o contato de microrganismos patogênicos com as células epiteliais, além de possuir efeito bactericida pela presença de lisozima e ácidos graxos de baixo peso molecular (MELLO et al., 2013). A lisozima, por sua vez, é uma substância importante no sistema inato de defesa dos peixes e a dosagem de sua concentração e/ou atividade é imprescindível visto que possui a capacidade de lisar bactérias. Sua ação bactericida está associada principalmente à hidrolização do peptidoglicano das paredes celulares bacterianas (URIBE et al., 2011).

Os parâmetros hematológicos constituem um dos principais indicadores no monitoramento da saúde dos peixes (BARBIERI e BONDIOLI, 2013; PEREIRA et al.,

2016). Autores relatam que o sangue pode revelar condições internas de forma mais precoce em relação à manifestações clínicas externas (RANZANI-PAIVA et al., 2013; TELLI et al., 2014; TAVARES-DIAS et al., 2015). Isso ocorre porque o sangue apresenta propriedades que devem estar equilibradas com os demais tecidos, desempenhando papel na hemostasia, respiração, transporte, osmorregulação, defesa e nutrição (COSTA et al., 2014, PEREIRA et al., 2015). Além disso, a análise hematológica representa um diagnóstico rápido, prático e de baixo custo (TAVARES-DIAS et al., 2015; WEINERT et al., 2015).

A resposta imune inata ou inespecífica é uma modalidade de resposta inflamatória dirigida contra antígenos no primeiro contato do organismo (MARCUSO et al., 2021). As células fagocíticas ou fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) desempenham importante papel no sistema imunológico uma vez que além de contribuírem nos mecanismos inatos estão também envolvidas com a parte específica de defesa (RODRIGUES et al., 2020). No que diz respeito à suas atividades na resposta inata, essas células são capazes de reconhecer patógenos e degradá-los através de um processo conhecido como fagocitose. Este processo ocorre quando a célula engloba o patógeno pela emissão de pseudópodes e, uma vez que este encontra-se totalmente incluso dentro de um vacúolo (fagossomo) ocorre uma série de eventos microbicidas que culminam na sua morte e digestão (BILLER-TAKAHASHI et al., 2014). Durante o processo de fagocitose há um grande aumento no consumo de oxigênio molecular, conhecido como *burst* oxidativo (DEGASPERI et al., 2019).

A atividade de explosão respiratória de leucócitos, também conhecida como *burst* respiratório ou *burst* oxidativo é também um dos indicadores da imunidade inata, tendo sido enfatizada pela primeira vez por Baldrige e Gerard (1933) ao constatarem que a fagocitose era associada ao consumo elevado de oxigênio. Atualmente está correlacionada também com a liberação de citocinas e resposta inflamatória em peixes (RIEGER et al., 2010). O consumo elevado de oxigênio ocorre devido a capacidade dos fagócitos em produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o processo de fagocitose, atuando contra agentes invasores (TELLI et al., 2014; URBINATI et al., 2015; LIU et al., 2017). Sabe-se que a enzima mieloperoxidase (MPO) atua como importante catalizador na formação das ERO e sua atividade antimicrobiana está ligada principalmente à capacidade de oxidar o

ânion cloreto (Cl⁻) em ácido hipocloroso (HOCl), importante agente oxidante, além da produção de outras espécies reativas na presença de H₂O₂, como o ácido hipobromoso (HOBr) e o ácido hipotiocianoso (HOSCN), radicais de tirosil e espécies reativas intermediárias de nitrogênio (ARATANI, 2018; KOCH et al., 2021). Entretanto, apesar da MPO desempenhar papel fundamental no combate à microrganismos patogênicos, quando há exacerbação da produção de agentes oxidantes, ela também pode contribuir para o aumento da inflamação, prejudicando os tecidos (CASCIARO et al., 2017; KHAN et al., 2018).

3.3 Probióticos na piscicultura

Na tentativa de controlar a disseminação de doenças nos organismos aquáticos criados, os produtores recorrem à utilização de antibióticos, o que despertou a motivação dos pesquisadores na busca por outros mecanismos de controle uma vez que o uso prolongado destes compostos químicos pode afetar negativamente os animais pela permanência de resíduos em seu organismo ou ainda pelo aumento do índice de resistência antimicrobiana (RINGO et al., 2020; PEREIRA et al., 2020).

A detecção de anticorpos específicos encontrados na mucosa intestinal em peixes se tornou a primeira evidência da associação do sistema imunológico associado à integridade da mucosa, abrindo margens para estudos sobre a aplicação de imunoestimulantes (XU et al. 2013). Dessa forma, como alternativa aos antibióticos, surgem os probióticos, descritos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Assim, a administração de probióticos pode ser um método sustentável e promissor para o controle de doenças em peixes (AKHTER et al., 2015; HILL et al., 2014).

O principal fator que permitiu a introdução dos probióticos na piscicultura foi o sucesso de sua aplicação em outros setores animais (XUE et al., 2020). Tachibana et al. (2019) sugerem que, na piscicultura, os probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos ou viáveis que, fornecidos via alimentação ou água, proporcionam benefícios no desempenho zootécnico, imunológico e digestivo, combatendo os agentes patogênicos e promovendo a diminuição do estresse do hospedeiro e/ou atuando como biorremediadores do ambiente aquático onde vivem.”.

Os probióticos fortalecem o sistema imunológico melhorando a homeostase intestinal, a absorção de nutrientes e o balanço de bactérias benéficas dentro do trato gastrointestinal (YAMASHITA et al., 2017; RUIZ, 2019). Como a microbiota intestinal desempenha um importante papel de modulação do sistema imunológico atuando contra patógenos, estes fatores contribuem ativamente na melhora nos índices produtivos (CAVALCANTE et al., 2020; ZHANG et al., 2022).

Diversos gêneros de microrganismos têm sido estudados como potenciais probióticos para utilização na aquicultura e sua determinação baseia-se em características específicas (MERRIFIELD e RINGO, 2014). Um probiótico tem como principal requisito a biossegurança, desta forma, para que um microrganismo seja considerado probiótico é necessário que não apresente características patogênicas pois não deve possuir efeito deletério ou prejudicial ao hospedeiro (BANERJEE et al., 2017; TACHIBANA et al., 2019). Outras características importantes na seleção de um probiótico são a tolerância a baixos níveis de pH e enzimas gástricas, adesão e colonização do epitélio intestinal, atividade antagonista frente a patógenos, promoção do crescimento e auxílio na imunoestimulação (MOURIÑO et al., 2012; CHAUHAN e SINGH, 2018). Além disso, deve ser tolerante a liofilização e manter a viabilidade após processo de embalagem e armazenamento (BANERJEE et al., 2017; CHAUHAN E SINGH, 2018).

No setor da aquicultura, as espécies mais estudadas e utilizadas são divididas em dois grupos: as bactérias colonizadoras, pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sp. e as bactérias não colonizadoras ou de trânsito livre, pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. (HUYGHEBAERT et al., 2011). *Lactobacillus* são bactérias não esporulantes, Gram positivas, apresentam formato de bastonetes, anaeróbicas e que produzem ácido lático como principal produto do seu metabolismo, sendo responsáveis por conferirem os melhores resultados zootécnicos como melhor conversão alimentar, menor mortalidade, maior resistência às condições de estresse, melhor imunidade e saúde geral nos animais (BUGLIONE-NETO et al., 2013; WU et al., 2023). Já *Bacillus* sp. são esporulantes, bastonetes Gram positivos e de trânsito livre cuja função principal é manter os parâmetros de qualidade da água, através da degradação da matéria orgânica, remoção do lodo e redução dos nutrientes da água, atuando como importantes biorremediadores (AZEVEDO et al., 2016; LOPES et al., 2020).

A inclusão de cepas probióticas alóctones é bastante aplicada principalmente em virtude dos baixos estudos acerca da resposta de cepas autóctones. Entretanto, a utilização de microrganismos exógenos pode apresentar algumas limitações e/ou desvantagens a exemplo da menor capacidade de interação com a microbiota natural, por se tratar de microrganismos transitórios (MARENGONI et al. 2019; TELLI, 2017; SOUZA e FERREIRA, 2022). A vantagem da utilização de cepas isoladas do próprio hospedeiro se deve ao fato de possuírem maior capacidade de colonização sobre o trato intestinal, permitindo aumento na eficiência de atividades antimicrobianas e moduladoras, além de apresentarem maior segurança uma vez que já compõem normalmente a microbiota local (STANDEN et al., 2016; BARROS et al., 2022).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi executado na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), no Instituto de Biodiversidade e Florestas (IBEF) e no Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas (ICTA), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP/Botucatu) Campus de Ciências Biológicas e Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Para as coletas de material biológico foram adotados Princípios Éticos na Experimentação Animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Comissão de Ética no Uso Animal, UFOPA, nº 0620180030).

4.1 Obtenção das cepas probióticas

Em experimento prévio do grupo de pesquisa, cepas de bactéria com potencial probiótico pertencente ao gênero *Lactobacillus* sp. foram isoladas do intestino de tambaquis *C. macropomum* oriundos do rio Amazonas, em Santarém — Pará (2°26'35.02"S e 54°42'29.99"W). Os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico utilizando benzocaína, com posterior coleta do aparelho gastrointestinal para semeadura em placa de Petri de 90 mm, contendo os meios de cultivo TSA (Trypticase Soy Agar)(Difco®) e MRS (de Man Rogosa & Sharpe) (Kasvi®) acrescido do corante Azul de Anilina. Em seguida, as placas foram acondicionadas em ambiente de anaerobiose a 37°C por 24 h. Ao final desse período,

foram realizados os isolamentos das cepas bacterianas, as quais foram direcionadas à testes de caracterização *in vitro* bem como ensaios comprobatórios de seu potencial uso probiótico em *C. macropomum*. Após caracterização genética através das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento genético, as cepas I10 (isolada do intestino) e M14 (isolada a partir de um *mix* do intestino e fezes) foram identificadas como *Lactobacillus* sp. e selecionadas por apresentarem os melhores resultados no ensaio *in vitro*, incluindo os testes de hidrofobicidade, resistência à bile, teste de antagonismo e formação de biofilme, além de apresentarem bons resultados no teste de patogenicidade *in vivo*.

4.2 Peixes e delineamento experimental

Foram utilizados 466 juvenis de tambaquis *C. macropomum* ($40,00 \pm 5,00$ g), de mesma reprodução, adquiridos de piscicultura comercial. Inicialmente, os peixes foram acondicionados em tanque (3000 L) para quarentena. Em seguida, 300 peixes foram distribuídos aleatoriamente em uma densidade de 37,5 peixes/m³ em 20 unidades experimentais (tanques circulares com 400 L / n=15), em sistema fechado e aeração constante no Laboratório Múltiplo para Produção de Organismos Aquáticos (LAMPOA / ICTA / UFOPA).

Os peixes receberam ração comercial extrusada, com 32% de proteína bruta (PB) e granulometria de 2 a 3 mm, durante a aclimação por 15 dias, sendo alimentados 3 vezes ao dia (8h30min, 12h e 17h) com a taxa de arraçoamento de 4% da biomassa de peixes. Durante o período experimental, houve mudança na granulometria da ração (4 a 6 mm) para adequação ao tamanho dos peixes. As caixas foram sifonadas diariamente para a retirada de fezes e restos de ração. Os parâmetros de qualidade da água como pH, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L) foram aferidos com equipamento multiparâmetro (AK88).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições cada, de acordo com a dieta a ser administrada. Para incrementação da dieta, duas cepas de bactérias ácido-lácticas (I10 — isolada do intestino de tambaqui e M14 — isolada de um “mix” de intestino e fezes de tambaqui) (DOS SANTOS, 2023). foram utilizadas e avaliadas separadamente Desta forma, os tratamentos consistiram em:

C – Controle: Dieta sem suplementação e fornecida 3 vezes ao dia (8h30min, 12h e 17h);

M14_3x: Dieta suplementada com a cepa M14 e fornecida 3 vezes ao dia (8h30min, 12h e 17h);

M14_1x: Dieta suplementada com a cepa M14 e fornecida 1 vez ao dia (8h30min);

I10_3x: Dieta suplementada com a cepa I10 e fornecida 3 vezes ao dia (8h30min, 12h e 17h);

I10_1x: Dieta suplementada com a cepa I10 e fornecida 1 vez ao dia (8h30min).

Ainda, as unidades experimentais eram observadas para identificação do consumo alimentar pelos peixes ao final de cada alimentação. A taxa de arraçoamento variou de 3,5 a 5 % da biomassa de peixes de cada unidade experimental, sendo ajustada de acordo com a observação do consumo alimentar e as biometrias dos peixes, realizadas a cada 10 dias.

4.3 Preparo dos inóculos bacterianos e dieta experimental

A concentração e dose da suspensão bacteriana para ambas as cepas e o modo de preparo da dieta foram estabelecidos seguindo os protocolos propostos por Jatobá et al. (2008), Farias et al. (2016), Ferreira et al. (2018) e Dias et al. (2022) com adaptações. Dessa forma, definiu-se a concentração 3×10^9 UFC/mL e a dose de 15mL/kg de ração fornecida.

A dieta suplementada era preparada ajustando cada suspensão bacteriana para a concentração definida, misturada a óleo de soja (3% da dieta) para melhor fixação, aspergida sobre os pellets de ração e submetidos à agitação manual. Após 30 min de descanso, os potes contendo cada ração suplementada eram então armazenados em geladeira para posterior administração aos peixes. Uma nova leva de ração foi preparada a cada 3 dias. Os animais foram alimentados 3 vezes ao dia, de acordo com cada tratamento (com ou sem dieta suplementada), durante o período de 90 dias de suplementação.

4.4 Obtenção da bactéria patogênica

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada para infecção e indução da sepse foi isolada de peixes naturalmente infectados que apresentaram lesões compatíveis com aeromonose (MARINHO-NETO et al., 2019). Os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína, seguida da coleta de fragmentos do encéfalo, rim, fígado e baço para cultura bacteriológica. Amostras desses fragmentos foram semeadas em placas de petri contendo TSA (Trypticase Soy Agar) (Difco®) e incubadas por 24h a 37°C. As colônias foram identificadas com base em suas características morfológicas e tintoriais seguida da caracterização bioquímica (Bactray 3 - Laborclin®). De forma similar à bactéria probiótica, a cepa em questão foi submetida à caracterização genética mediante a técnica de PCR e sequenciamento genético sendo, desta forma, identificada como *A. hydrophila*.

4.5 Determinação da DL50% (50-96h)

Para determinação da DL50% (50-96h), empregada como inóculo bacteriano foram utilizados 36 tambaquis de tamanho e peso aproximados aos do experimento, distribuídos em seis caixas d'água com seis animais/cada, em delineamento inteiramente casualizado. Para tanto, 30 tambaquis foram submetidos à inoculação com 0,5 mL de concentrações crescentes de *A. hydrophila*, correspondentes aos tubos 0,5; 2; 4; 8 e 10 da escala de McFarland ($0,15 \times 10^9$; $0,6 \times 10^9$; $1,2 \times 10^9$; $2,4 \times 10^9$ e 3×10^9 células bacterianas/mL), na cavidade celomática. Os animais do grupo controle (n=6) receberam uma dose de 0,5mL de solução salina esterilizada (0,65%) pela mesma via.

Durante o período de exposição (96h) não foi realizada a alimentação dos peixes nem sifonagem da água, sendo feito o monitoramento diário das variáveis físico-químicas da água (pH, temperatura e oxigênio dissolvido) e registro da taxa de mortalidade dos peixes. Os valores da DL50-96h foram calculados pelo método “*Trimmed Sperman Karber*”, obtendo a DL50 estimada em $1,78 \times 10^9$ e com o limite inferior e superior em $1,64 \times 10^9$ e $2,3 \times 10^9$, respectivamente (CLAUDIANO et al., 2019).

4.6 Indução da sepse

A sepse nos tambaquis foi induzida pela inoculação celomática da dose

correspondente a DL50% ($1,78 \times 10^9$). Para tanto, os peixes foram anestesiados com benzocaína (1:500 v/v), e divididos em grupos de acordo com cada tratamento descrito no item 4.1 (n=10), em delineamento inteiramente casualizado: T1 — (Controle positivo) — inoculado apenas com o inóculo bacteriano patogênico (0,5mL) sem suplementação com probiótico, C; T2 — suplementados com cepa M14 3 x e injetado com 0,5mL do inóculo bacteriano patogênico, M14 3x; T3 — suplementados com cepa M14 1x e injetado com 0,5 mL do inóculo bacteriano patogênico, M14 1x; T4 — suplementados com cepa I10 3x injetado com 0,5mL do inóculo bacteriano patogênico, I10 3x ; e T5 — suplementados com cepa I10 1x e injetado com 0,5mL do inóculo bacteriano patogênico, I10 1x.

No tempo de 24h após a indução da sepse, 10 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico, com solução de benzocaína (1:20.000), diluída em álcool 98° (0,1 g/mL) (WEDEMEYER, 1968).

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção do vaso caudal após os animais atingirem o quarto estágio de anestesia segundo Ross e Ross (2008), com auxílio de agulha (25x7) e seringa (3mL) esterilizada. O soro foi obtido por centrifugação a 1.200g, durante 5 min a 4°C, seguido de armazenagem em freezer -80°C para análises posteriores.

4.7 Variáveis clínicas laboratoriais

4.7.1 Hemocultura e sinais clínicos

A fim de confirmar a infecção por *A. hydrophila*, 100µL do sangue coletado de cada grupo (n=6) foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Difco®) e incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Após esse período as placas foram visualizadas quanto ao crescimento das colônias bacterianas presentes nas amostras de sangue.

Os peixes foram ainda analisados quanto aos sinais externos e internos característicos de aeromonose, sendo os externos: ocorrência de petéquias, corrosão das nadadeiras, ulcerações oculares, distensão abdominal e exoftalmia. Para visualização interna, os animais foram eutanasiados com sobredose de benzocaína (1:500 v/v), lavados com álcool 70% e necropsiados assepticamente.

4.7.2 Hemograma

Uma alíquota do sangue total foi destinada para análises hematológicas que incluem contagem do número de eritrócitos/Ert, contagem de leucócitos, taxa de hematócrito/VG, taxa de hemoglobina/Hb, volume corpuscular médio/VCM ($VG \times 10/Ert$); hemoglobina corpuscular média/HCM ($Hb \times 10/Ert$) e concentração de hemoglobina corpuscular média/CHCM ($Hb \times 100/VG$).

Para a contagem dos eritrócitos do sangue (Ert) foi realizada a técnica de macrodiluição na qual 10 μ L de amostra foi aliquoteada em 2 mL da solução de Natt e Hyerrick (1952). Em seguida, uma alíquota foi cuidadosamente pipetada em câmara de Neubauer e observada em microscópio com aumento de 40x. O resultado foi calculado multiplicando-se o número de hemáceas contadas pelo fator de correção para macrodiluição:

$$RBC = 201 \times 5 \times 10 \times n^{\circ} \text{ eritrócitos}$$

A taxa de hematócrito foi realizada pela técnica de microhematócrito, utilizando tubos capilares com umas das extremidades fechadas e submetidos à centrifugação por 5 minutos em 1100 rpm. Em seguida, foram comparados com o cartão de leitura para hematócrito.

A hemoglobina foi aferida aplicando-se o método de Drabkin no qual 50 μ L de cada amostra foi pipetado em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução de Drabkin (ferricianeto de potássio, cianeto de potássio e água destilada) e homogeneizados. Após 5 min seguiu-se a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm, utilizando Drabkin como branco. A contagem de leucócitos totais se deu por método indireto estabelecido por Hrubc e Smith (1998), aplicando-se a fórmula:

$$\text{Leucócitos totais} = \text{Leucócitos} \times \text{Eritrócitos}/2000$$

A contagem diferencial foi obtida a partir do número relativo (%) de cada leucócito (linfócitos, monócitos, granulócitos e trombócitos):

$$\text{Leucócitos totais} \times \text{Leucócito relativo}/100$$

4.7.3 Perfil bioquímico sérico

As análises das variáveis bioquímicas presentes nas amostras de soro foram realizadas através do analisador bioquímico COBAS MIRA[®], utilizando uma alíquota de 100µL para cada amostra. A calibração foi realizada com calibrador protéico H e o controle de qualidade interno utilizando o soro controle Qualitrol H (Labtest Diagnóstica[®]).

As variáveis analisadas foram glicose/GLIC (método enzimático Trinder), colesterol/COL (método enzimático Trinder), triglicerídeos/TRIG (método enzimático Trinder), albumina/ALB (método verde de bromocresol), proteínas totais/PT (método do biureto), aspartato aminotransferase/AST (método cinético UV), alanina aminotransferase/ALT (método cinético UV) e fosfatase alcalina/FA (método cinético colorimétrico – Roy modificado). Além disso, foram calculadas ainda os níveis de globulina (Globulina = ALB - PT).

4.8 Análise da imunidade inata

4.8.1 Produção de espécies reativas de oxigênio em leucócitos no sangue

A fim de avaliar o surto oxidativo de leucócitos do sangue dos peixes foi utilizado o sangue total de todas as amostras coletadas (ANDERSON e SIWICKI, 1995; CASTRO et al., 2014). Este método consiste em uma determinação colorimétrica das espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pela explosão respiratória ou *burst* oxidativo dos leucócitos que reduzem o “nitroblue tetrazolium” (NBT) em precipitado azul-escuro dentro do fagócito, chamados grânulos de formazan (BILLER-TAKAHASHI et al., 2013). Desta forma, uma pastilha do corante “nitrobluetetrazolium” (NBT) foi dissolvida em 5mL de PBS (1x ph 7,2). Em seguida, 100 µL de sangue (com EDTA) foi adicionado em 100µL da solução de NBT mais 25µL de PMA 10-5 (Forbol-12-Miristato-13-Acetato, 99% - 1mg). Após, a mistura foi incubada por um período de 30 min no escuro. Decorrido este tempo, 50µL da suspensão foi colocada em tubo de ensaio contendo 1,0mL de DMF (N,N-dimetilformamida) agitado com auxílio de micropipeta seguida de centrifugação a 1500 x g por 5 min. O sobrenadante foi então retirado e a densidade óptica da solução determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

4.8.2 Determinação da concentração de lisozima sérica

A concentração de lisozima sérica foi determinada por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptada por Marzocchi Machado et al. (1999), Barbosa (2011) e Castro et al. (2014), estando estabelecida em três etapas: construção de curva de calibração, inativação das amostras de soro e determinação da concentração de lisozima.

Uma curva padrão, utilizando lisozima liofilizada (1mg/mL^{-1}) de clara de ovo de galinha nas concentrações de 5, 10, 100, 200, 250 e 300ng lisozima/300 μL , suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2mg/mL) em tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) foi preparada e lida em leitor de placa em 450nm. Como branco apenas tampão fosfato foi utilizado na mesma concentração. Os resultados foram expressos como a diferença entre a densidade ópticas iniciais e finais utilizados para quantificação das concentrações de lisozima nas amostras.

Para garantir que a lise de *M. lysodeikticus* seja via lisozima e não via proteínas do sistema complemento, as amostras de soro e plasma foram submetidas à inativação pelo calor em banho a 45°C por 30 min antes da análise.

Por fim, 50 μL de soro inativado foi adicionado a 100 μL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), cuja solução foi previamente levada ao leitor de microplaca para incubação durante dois minutos a 26°C. Em seguida, uma suspensão de *M. lysodeikticus* (150 μL) foi adicionada a solução, obtendo-se um volume final de 300 μL . A redução da densidade óptica (ΔDO) foi avaliada em 450nm entre 0 e 15 minutos a 26°C. A concentração da lisozima ($\mu\text{g/ mL}^{-1}$) foi correspondente a redução da ΔDO para cada volume da amostra avaliada.

4.8.3 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

O ensaio da MPO foi realizado em placa de 96 poços com adição de 25 μL de soro sem inativação, 125 μL de solução balanceada de Hanks (HBSS) sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , 20 μL de tetrametilbenzidina (TMB 20mM - Sigma®) e 50 μL de H_2O_2 30% (5mM) em cada poço. Após 2 min a temperatura ambiente, adicionou-se 50 μL de ácido sulfúrico 4M (H_2SO_4) diluído para interromper a reação e procedeu-se a leitura a 450 nm em leitor de microplacas. A atividade de MPO foi definida como 1 μmol de H_2O_2 reduzida para cada microlitro de soro a 30°C de temperatura (QUADE e ROTH, 1997; CORDERO et al., 2016).

4.8.4 Atividade de aglutinação bacteriana (AAB)

Inicialmente houve o preparo da bactéria patogênica *A. hydrophila* com duas lavagens em tampão fosfato de sódio (PBS) sendo diluída no mesmo tampão até atingir a densidade óptica (DO) $A_{600} = 0,140$. Em seguida, foram realizadas diluições em série de 50 μ L de soro com o mesmo volume de PBS (pH 7,2) em cada poço, para a adição de 50 μ L de *A. hydrophila* inativada em banho-maria a 60°C por 40 minutos. As placas foram incubadas durante o período de 1 hora a 30°C, e, após, deixadas *over night*, a 4°C. O título foi calculado como o recíproco da diluição mais elevada de soro equivalente a aglutinação completa das células bacterianas, por meio de leitura visual das placas comparada ao padrão de sedimentação do poço de controle sem soro com os padrões de sedimentação dos demais poços. O título de anticorpos totais foi identificado como a maior diluição em que será possível observar a aglutinação positiva. Os resultados foram expressos no log₂ dos recíprocos dos títulos dos soros (FERNANDES et al., 2015).

4.9 Análise metagenômica

Para análise da microbiota intestinal, os peixes suplementados e do controle (n=9) sofreram eutanásia por anestesia profunda, com benzocaína (1:500 v/v) e, após assepsia local com álcool 70% G.L., foi exposta a porção final do intestino para coleta das fezes/epitélio, realizado pelo toque na região com auxílio alça para microbiologia estéril e transferido para solução tampão (NeoSample-X®).

O mapeamento da microbiota intestinal dos tambaquis foi realizado pelo sequenciamento utilizando o sistema MiSeq (Illumina, EUA). Inicialmente foram preparadas as bibliotecas para sequenciamento de amplicons de bactérias utilizando os oligonucleotídeos 341F e 806R específicos para a região V3/V4 do gene 16S rRNA em um protocolo de PCR de duas etapas (WANG e QIAN, 2009; CAPORASO et al., 2012). Os *primers* utilizados na primeira PCR, além de conterem região alvo específica para a região V3/V4, possuem também uma região correspondente a um adaptador Illumina parcial, baseado na estrutura TruSeq (Illumina, EUA). A presença deste adaptador permite uma segunda PCR que adiciona as sequências de indexação conforme procedimentos descritos. A indexação foi realizada com índices duplos exclusivos para cada amostra na segunda PCR. Em seguida, 2 μ L do DNA extraído de

cada amostra foram utilizados como molde na primeira reação de PCR, utilizando Platinum Taq (Invitrogen, EUA) com as condições: 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45s, 55 °C por 30s e 72°C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 2 min para PCR 1. Na PCR 2 as condições foram 95 °C por 5 min, 10 ciclos de 95 °C por 45s, 66 °C por 30s e 72 °C por 45s e uma extensão final de 72 °C por 2 min. Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata. As reações finais de PCR foram purificadas utilizando Neobeads® (Beads magnéticas a base de Sera-Mag™) e um volume equivalente de cada amostra foi adicionado ao *pool* de sequenciamento. Em cada rodada de PCR, um Controle Negativo de Reação (CNR) foi incluído. O *pool* de sequenciamento foi ajustado para uma concentração final de 11 pM (para kits V2) ou 17,5 pM (para kits V3) e sequenciado no sistema MiSeq (Illumina, EUA), empregando os *primers* de sequenciamento Illumina, fornecidos com o kit do fabricante. As corridas *paired-end* foram realizadas utilizando kits de sequenciamento V2x500 ou V3x600 (Illumina, EUA) com 100 mil *reads* de cobertura por amostra (n=9).

As sequências foram analisadas por meio do *pipeline* Sentinel. No *pipeline* Sentinel os arquivos fastq são avaliados quanto a qualidade Phred (QP) usando o programa FastQC v.0.11.8 (ANDREWS, 2010). A seguir, os arquivos fastq foram submetidos à trimagem de *primers* e sequências com baixa qualidade (Phred < 20). O *software* proprietário utilizado para tal finalidade foi construído em *Python* v.3.6, sendo este inspirado nas funcionalidades do projeto *BioPython* (COCK et al. 2009). Para dados *paired-end*, antes da etapa de trimagem, dois pares de arquivos (R1 e R2) foram unidos em só arquivo usando pandaseq v.2.11 (MASELLA et al., 2012). *Clusters* com abundância menor do que 2, foram removidos das análises, pois tais estruturas normalmente são relacionadas a sequências quimeras (SMYTH et al., 2010). As identificações taxonômicas foram realizadas com blastn v.2.6.0+ (ALTSCHUL et al., 1990), usando como referência um banco de dados proprietário ou público. Quanto a definição de uma espécie, dentre os 20 hits retornados para cada *cluster*, uma instrução em *Python* avalia se um dos três quesitos são atendidos pelos hits: 1) maior *bit-score*; 2) menor *evaluate*; e 3) taxonomias com maior representação. Os hits que atenderam um dos itens anteriores, foram escolhidos como espécie representante. As análises foram realizadas na plataforma computacional da Amazon. As análises de DMD Bactéria, podem ser feitas contra bancos de dados de referência para os genes 16S rRNA e ITS proprietários ou públicos. Espera-se nos bancos de sequências para

os genes 16S rRNA e ITS, contam com sequências de genes completos (em sua maioria), os quais contém sequências recuperadas de genomas, não ambíguas e filtradas para sequências quimeras. Os bancos de dados públicos que temos à disposição são o Silva (QUAST et al., 2013) e Greengenes (DESANTIS et al., 2006).

4.10 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 10* e os resultados estão apresentados com as médias e o desvio padrão. Para a determinação das diferenças entre as variáveis dos tratamentos foi utilizado ANOVA e o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Variáveis clínicas laboratoriais

5.1.1 Hemocultura e sinais clínicos

A sepse foi confirmada pela hemocultura positiva com alterações clínicas observadas por hemorragia aparente na parte externa, principalmente nas brânquias. Foram verificadas petéquias distribuídas ao longo da superfície corporal, nadadeiras corroídas e eritrodermatite em todos os grupos. apresentaram ulcerações oculares, exoftalmia e distensões abdominais mais aparentes do que os peixes dos grupos suplementados. Além disso, a análise visual dos órgãos internos permitiu notar que os animais que não receberam nenhuma dieta suplementada apresentaram os órgãos mais flácidos com os rins menos íntegros e fígados com coloração esverdeada, enquanto os animais que foram suplementados com os probióticos apresentaram coloração do fígado menos alterada, mais próxima do vermelho escuro (Figura 1).

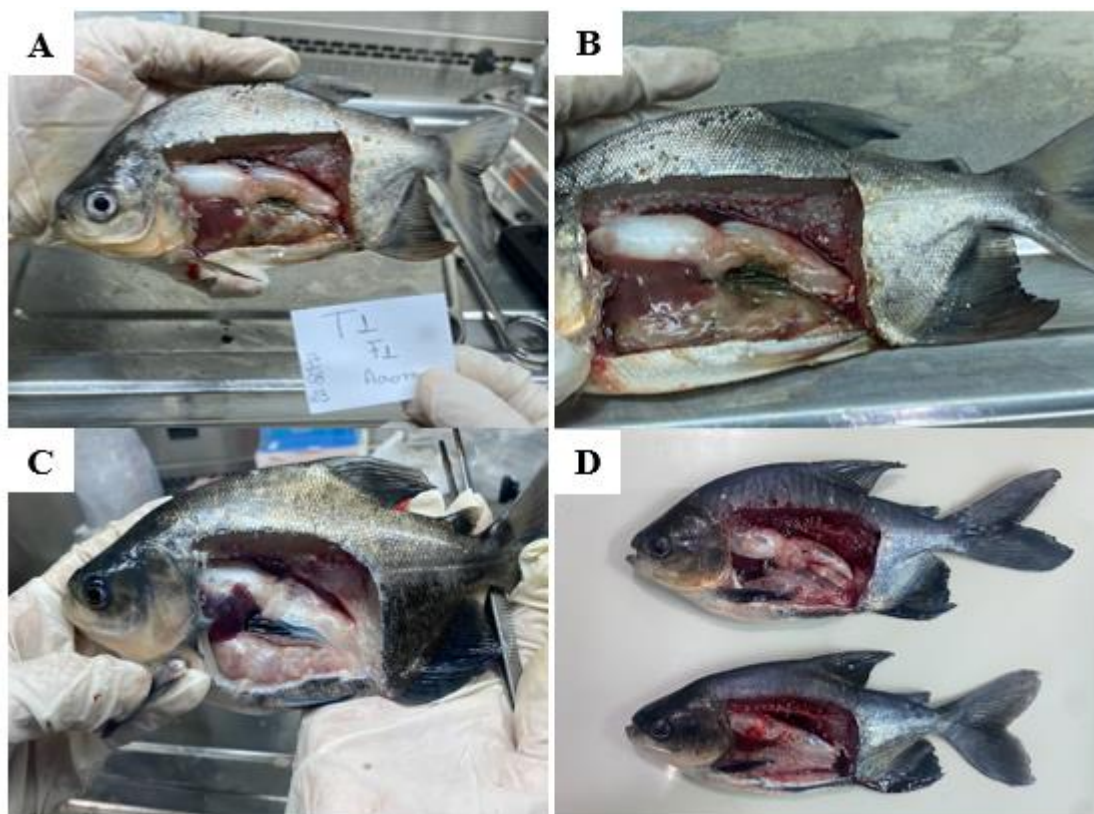


Figura 1 – Sinais clínicos em *Colossoma macropomum* desafiados com *Aeromonas hydrophila*: A, B) peixes do grupo controle e C, D) peixes suplementados com as cepas de bactérias probióticas.

5.1.2 Hemograma

As alterações causadas no hemograma pela indução da sepse nos tambaquis suplementados com probióticos podem ser observadas na Tabela 1. Na análise do eritrograma verificou-se redução dos eritrócitos e do hematócrito nos peixes do grupo controle em relação aos peixes septicêmicos suplementados ($p < 0,05$). Para os índices hematimétricos, os grupos suplementados apresentaram redução do HCM, à exceção de M14 3x e VCM, à exceção de M14 1x ($p < 0,05$). Não foi verificado diferença ($p > 0,07$) na taxa de hemoglobina e na concentração de hemoglobina corpuscular média/CHCM ($p > 0,05$).

No leucograma verificou-se leucopenia nos peixes do grupo controle em relação aos peixes suplementados com ambas as cepas probióticas e desafiados com *A. hydrophila* ($p < 0,05$, tabela 1). Ainda na Tabela 1 foi observado trombocitopenia nos peixes do grupo controle em relação aos peixes suplementados com probióticos ($p < 0,05$), sem diferença estatística na contagem de linfócitos, monócitos e granulócitos em relação aos peixes do grupo controle ($p > 0,05$). Na

contagem de granulócitos, os peixes do M14 3x apresentaram granulocitose em relação aos suplementados com M14 1x, sem diferir do controle ($p>0,05$). Dentre os granulócitos, apenas os neutrófilos foram contabilizados sem diferença estatística entre os peixes suplementados e os do controle. Os eosinófilos apareceram apenas em 1 indivíduo do grupo controle desafiado, com ausência completa nos demais grupos. De forma similar, não foi possível verificar a presença de basófilos para nenhum grupo.

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros hematológicos de *Colossoma macropomum* suplementados com cepas de bactérias probióticas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Variáveis	Grupos														
	Controle		M14 3x		M14 1x		I10 3x		I10 1x						
Hb (g/dL)	8.0	\pm 1.1	A	8.2	\pm 1.1	A	8.3	\pm 1.2	A	8.1	\pm 1.1	A	8.3	\pm 1.3	A
VG (%)	37.8	\pm 1.2	B	46.2	\pm 1.2	A	44.4	\pm 1.2	A	41.7	\pm 1.2	A	39.4	\pm 1.0	AB
Ert ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	1.1	\pm 1.1	B	1.2	\pm 1.2	A	1.5	\pm 1.2	AB	1.7	\pm 1.4	A	2.1	\pm 1.2	A
VCM (μm^3)	324.2	\pm 1.2	A	266.1	\pm 1.3	AB	310.5	\pm 1.4	A	251.4	\pm 1.3	B	191.1	\pm 1.2	B
HCM (pg)	68.9	\pm 1.2	A	47.0	\pm 1.3	B	58.5	\pm 1.3	AB	50.6	\pm 1.4	B	40.9	\pm 1.3	B
CHCM (%)	21.9	\pm 1.2	A	18.4	\pm 1.3	A	19.5	\pm 1.3	A	20.0	\pm 1.2	A	21.2	\pm 1.2	A
LT ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	58.9	\pm 1.1	B	90.4	\pm 1.2	A	74.8	\pm 1.2	A	88.6	\pm 1.4	A	106.1	\pm 1.2	A
Linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	11.1	\pm 2.8	A	6.8	\pm 1.8	A	4.7	\pm 2.2	A	5.7	\pm 2.6	A	7.7	\pm 2.6	A
Monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	3.5	\pm 3.0	A	1.4	\pm 2.1	A	1.6	\pm 2.2	A	2.5	\pm 2.3	A	1.1	\pm 2.0	A
Granulócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	2.9	\pm 2.2	AB	4.2	\pm 1.6	A	1.3	\pm 1.8	B	2.4	\pm 2.0	AB	3.0	\pm 2.2	AB
Trombócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	41.5	\pm 1.2	C	78.0	\pm 1.2	AB	67.1	\pm 1.2	B	68.1	\pm 1.4	AB	94.4	\pm 1.2	A

Médias com letras em comum entre colunas não diferiram pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Hb – taxa de hemoglobina, VG – taxa de hematócrito, Ert – eritrócitos, VCM – volume corpuscular médio, HCM – hemoglobina corpuscular média, CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média, LT – leucócitos totais. M – grupos suplementados com cepas do mix de intestino e fezes, I – grupos suplementados com cepas apenas do intestino. 3x e 1x correspondem à frequência de alimentação.

5.1.3 Perfil bioquímico sérico

As variáveis bioquímicas dos peixes desafiados com *A. hydrophila* podem ser observadas na Tabela 2. Ao exame dos metabólicos sanguíneos se verificou que os grupos suplementados tiveram aumento nos níveis de triglicerídeos ($p<0,05$) em relação ao grupo controle (153,4 mg/dL, $p<0,05$). Além disso, foi verificado que a concentração de AST e ALT liberadas na corrente sanguínea nos peixes suplementados tiveram redução em relação ao controle, com diferença estatística nos grupos M14 1x e I10 1x e I10 1x, respectivamente (Tabela 2). Não foram verificadas diferenças significativas ($p>0,05$) para os níveis de glicose (GLIC), colesterol (COL), proteínas totais (PT) e globulinas, nem para albumina (ALB) e fosfatase alcalina (FA) observadas nas amostras de soro dos tambaquis suplementados em relação aos não suplementados com probióticos ($p>0,05$, tabela 2).

Tabela 2. Valores médios±desvio padrão das variáveis bioquímicas em *Colossoma macropomum* suplementados com cepas de bactérias probióticas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Variáveis	Grupos														
	Controle			M14 3x			M14 1x			I10 3x			I10 1x		
GLIC (mg/dL)	88.4	± 1.3	A	85.6	± 1.4	A	85.0	± 1.3	A	89.8	± 1.3	A	104.8	± 1.3	A
COL (mg/dL)	124.7	± 1.0	A	132.7	± 1.2	A	119.9	± 1.2	A	124.5	± 1.3	A	123.2	± 1.2	A
TRIG (mg/dL)	153.4	± 1.0	B	209.9	± 1.1	A	181.1	± 1.2	A	187.5	± 1.2	A	199.8	± 1.2	A
ALT (U/dL)	9.2	± 1.4	A	9.8	± 1.3	A	8.3	± 1.2	AB	8.1	± 1.8	AB	6.5	± 1.3	B
AST (U/dL)	181.5	± 1.4	A	174.1	± 1.3	AB	123.0	± 1.5	B	180.0	± 1.4	AB	123.3	± 1.3	B
FA (U/dL)	37.5	± 1.3	A	54.3	± 2.3	A	34.4	± 2.5	A	27.1	± 1.7	A	40.6	± 1.7	A
PT (g/dL)	3.1	± 1.1	A	3.1	± 1.1	A	3.2	± 1.1	A	3.0	± 1.1	A	3.1	± 1.2	A
ALB (g/dL)	0.9	± 1.0	A	0.9	± 1.0	A	0.9	± 1.1	A	0.9	± 1.1	A	0.9	± 1.0	A
Globulinas (g/dL)	2.2	± 1.2	A	2.2	± 1.1	A	2.3	± 1.1	A	2.1	± 1.1	A	2.2	± 1.2	A

Médias com letras em comum não diferiram pelo teste de Tukey ($p>0,05$). GLIC – glicose, COL – colesterol, TRIG – triglicerídeos, ALT – alanina aminotransferase, AST – alanina aminotransferase, FA – fosfatase alcalina, PT – proteínas totais, ALB – albumina. M – grupos suplementados com cepas do mix de intestino e fezes, I – grupos suplementados com cepas apenas do intestino. 3x e 1x correspondem à frequência de alimentação.

5.2 Análise da imunidade inata

5.2.1 Produção de espécies reativas de oxigênio em leucócitos no sangue

Na Figura 2 verifica-se a produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) que ocorre durante a atividade respiratória de leucócitos dos tambaquis. Apesar do número de leucócitos se mostrar significativamente menor no grupo controle, esse resultado não refletiu na concentração de ERO, uma vez que não houve diferença na respiração leucocitária entre os peixes dos diferentes tratamentos.

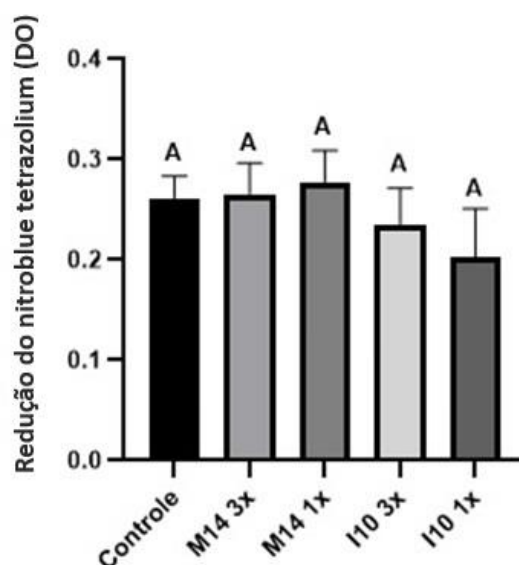


Figura 2 – Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) avaliada através da redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT) em decorrência do *burst* oxidativo em *Collossoma macropomum* suplementados com cepas de bactérias probióticas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). ERO – espécie reativas de oxigênio.

5.2.2 Determinação da concentração de lisozima sérica

A curva de calibração utilizada para calcular a concentração de lisozima sérica das amostras de soro dos tambaquis podem ser observadas na Figura 3A. Todos os peixes suplementados apresentaram concentração de lisozima maior que o grupo controle. Apesar disso, apenas os grupos I10 3x e I10 1x apresentaram as diferenças nas concentrações da enzima ($p < 0,05$), com 745,5 ng/ μ L e 582 ng/ μ L, respectivamente, diferindo do grupo controle que apresentou concentração 352,8 ng/ μ L (Figura 3B).

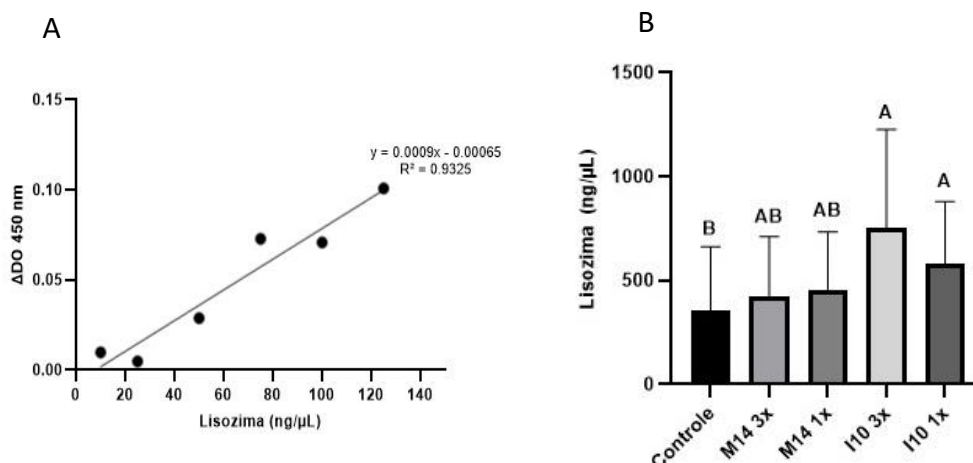


Figura 3 – A) Curva de calibração para determinação da concentração de lisozima sérica e B) concentração de lisozima nas amostras de soro de *Colossoma macropomum* desafiados com *Aeromonas hydrophila*. As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). ΔDO – corresponde a diferença entre a densidade inicial e a final; R²- coeficiente de determinação.

5.2.3 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

Quanto à atividade da enzima mieloperoxidase, os valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle foram verificados para os peixes em M14 1x e I10 1x, observados pelo aumento da densidade óptica (DO) nestes grupos (Figura 4).

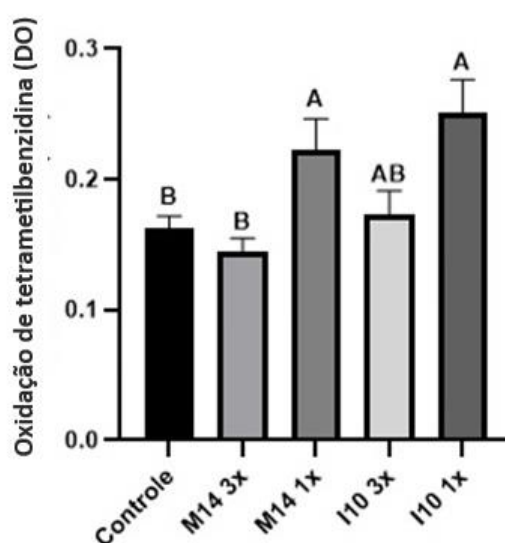


Figura 4 – Atividade da mieloperoxidase (MPO) pela oxidação do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em *Colossoma macropomum* suplementados com cepas de bactérias probióticas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes

tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

5.2.4 Atividade de aglutinação bacteriana

Na Figura 5 observa-se a capacidade de aglutinação dos anticorpos dos tambaquis contra *A. hydrophila* e demonstra que houve aumento ($p < 0,05$) dos títulos de anticorpos nos grupos M14 3x e M14 1x em relação ao grupo controle e ao grupo I10 3x.

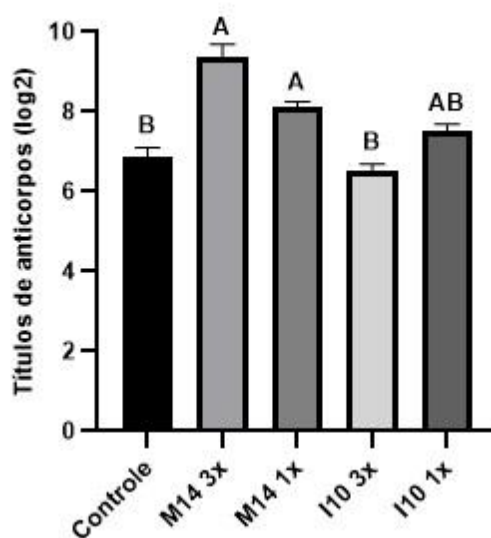


Figura 5 – Valores dos títulos de anticorpos naturais para *Colossoma macropomum* suplementados com cepas de bactérias probióticas e desafiados com *Aeromonas hydrophila*. As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste Dunn (5%).

5.3 Análise metagenômica

O sequenciamento das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA permitiu identificar um total de 548976 espécies bacterianas pertencentes a 140 gêneros oriundos do muco epitelial dos animais após suplementação e indução da sepse, com maior diversidade encontrada nos grupos de peixes suplementados com os probióticos.

O gênero mais abundante foi o *Enterobacter*, presente em todos os grupos, seguido dos gêneros *Citrobacter* e *Cetobacterium* (Figura 6). A espécie *Cetobacterium somarae* foi verificada com maior abundância nos grupos que receberam as dietas suplementadas, em especial o grupo M14 1x (Figura 7).

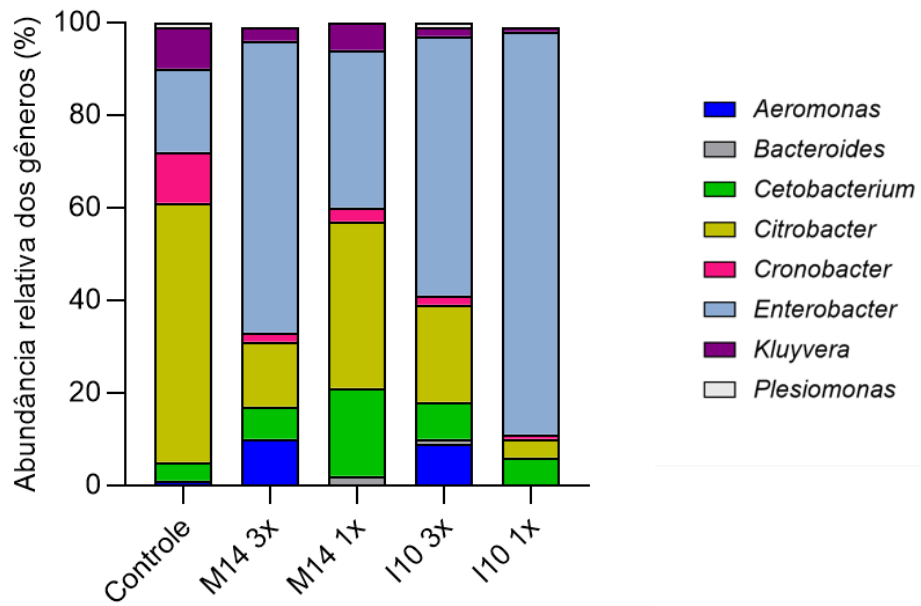


Figura 6 – Abundância relativa dos principais gêneros presentes nos grupos amostrais de *Colossoma macropomum* após 90 dias de suplementação com as cepas probióticas seguido do desafio com *Aeromonas hydrophila*.

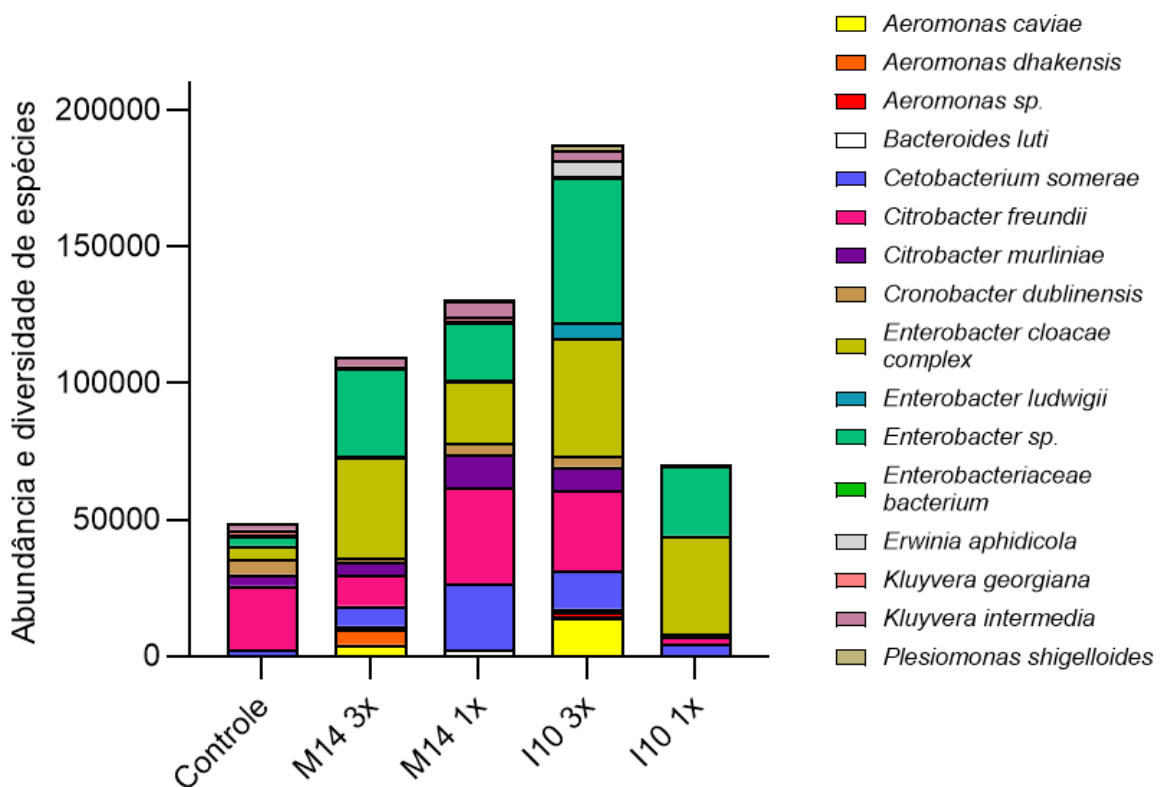


Figura 7 – Abundância e diversidade das principais espécies presentes nos grupos amostrais de *Colossoma macropomum* após 90 dias de suplementação com as cepas probióticas seguido do desafio com *Aeromonas hydrophila*.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, a inoculação de *A. hydrophila* na cavidade celomática induziu a sepse nos tambaquis, evidenciada pelas alterações clínicas, imunológicas e na microbiota intestinal. A sepse induziu hemorragia interna e sinais característicos de aeromonose em todos os grupos. Esses achados são compatíveis com os descritos por Claudiano et al. (2019) e Marinho-Neto et al. (2019), em peixes tropicais com aeromonose. Entretanto, os peixes que receberam administração dos probióticos apresentaram órgãos menos comprometidos com menor flacidez e menores alterações de textura e cor, enfatizando que a suplementação com os probióticos autóctones contribuíram para amenização dos sinais característicos de infecção por *A. hydrophila*.

Os tambaquis que não receberam nenhuma dieta suplementada apresentaram valores mais baixos no hematócrito e na contagem de eritrócitos. Essas condições estão relacionadas, uma vez que a contagem de eritrócitos pode influenciar no valor do hematócrito, cuja redução é fator característico do processo séptico (VOSYLIENÉ et al., 1999; JUNCAL et al., 2011; NEVES et al., 2018; AKHTER et al., 2018). Estudos comprovam que a adição de probióticos na dieta de peixes provoca um aumento nos valores de VG (ALY et al., 2008; JATOBÁ et al., 2018; MARENGONI et al., 2019; JATOBÁ et al., 2020; DIAS et al., 2022). Em contrapartida, a indução da sepse influencia na redução destes mesmos valores (HARIKRISHNAN et al., 2003; YU et al., 2018; ABD et al., 2019; CLAUDIANO et al., 2019; CHEN et al., 2020). Assim, tendo evidenciado valores maiores de VG para os grupos suplementados e levando em consideração que os animais foram induzidos à sepse, possivelmente a adição das cepas probióticas influenciaram para manutenção do hematócrito, que não foi afetado consideravelmente pelo processo séptico. Resultados semelhantes foram observados em tambaquis desafiados com *A. hydrophila* que receberam dieta suplementada por um período de 120 dias com cepas de *B. Cereus* autóctones (DIAS et al., 2021).

Resumidamente, a perda significativa dos glóbulos vermelhos pode estar associada a uma condição de anemia ou hemorragia, como os observados em peixes em septicemia (CLAUDIANO et al., 2019). Os resultados obtidos nesse estudo mostram que a redução dos eritrócitos ocorreu de modo mais severo nos peixes não suplementados, sugerindo que as cepas probióticas podem ter

contribuído para estabilidade nos níveis dessas células. Esses dados corroboram aos encontrados em robalos (*Centropomus parallelus*) suplementados com *Lactobacillus plantarum* (BARBOSA et al., 2011), e diferindo dos observados em robalos-flecha (*Centropomus undecimalis*) suplementados com *Bacillus subtilis* (NOFFS et al., 2015), diferença que, segundo os autores, pode ser devido a espécie de probiótico e/ou peixes empregados.

A adição dos probióticos também influenciou na regulação dos leucócitos totais nos tambaquis, reforçando o potencial das cepas utilizadas em auxiliar o sistema imunológico e corroborando com o encontrado em outras espécies de peixes que também foram suplementados com bactérias ácido-lácticas (SOUSA et al., 2019; PAIXÃO et al., 2020; DIAS et al., 2021). O efeito imunoestimulante fornecido pelas bactérias probióticas pode ser atribuído à estimulação do tecido linfóide associado ao intestino que, ao detectar microrganismos invasores, induz a ativação de defesa do organismo (FERIA et al., 2017; DIAS et al., 2021; CROSS et al., 2022) Todos os grupos de tambaquis que receberam dieta suplementada apresentaram números mais elevados de trombócitos em relação ao grupo controle. Similarmente, o uso de aditivo probiótico aumentou o número de trombócitos em híbrido de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*) suplementado com os simbióticos *Weissella cibaria* e *Lactobacillus plantarum* associados a inulina (MOURIÑO et al. 2017) bem como em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) suplementada com *Lactobacillus acidophilus* por 90 dias (FARAMAZI, 2011). Entretanto, em outras espécies de peixes como em robalos (*C. parallelus*) suplementados com *B. subtilis* (BARBOSA et al., 2011) e em tilápias-do-nilo (*O. niloticus*) suplementadas com *Enterococcus faecium* e *B. subtilis* (DIAS et al., 2022), foi identificado trombocitopenia. Não foram verificadas alterações significativas no número de trombócitos entre os grupos tratados e o controle na avaliação da suplementação de robalos-flecha com *B. Subtilis* (NOFFS et al., 2015), nem em tillápias-do-nilo que receberam dieta suplementada com *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *E. hirae* e *H. faecium* (SATO, 2019).

Os trombócitos desempenham importante papel na coagulação sanguínea e sua associação com o processo séptico se deve ao fato de que a redução dessas células facilita a ocorrência de hemorragias (BOECHAT et al., 2012; GOMES et al., 2021). Este fato é comprovado por Lima et al. (2019) e Claudiano

et al. (2019), onde verificaram redução no número de trombócitos a partir da terceira hora pós-infecção com *A. hydrophila* em *P. mesopotamicus*. De acordo com Tavares-Dias e Oliveira (2008), a redução se deve ao consumo pela coagulação intravascular disseminada que acompanha a sepse, ocasionando distúrbios hemorrágicos e/ou aumento destas células no exsudato inflamatório (CLAUDIANO et al., 2013; MARINHO-NETO et al., 2019). No presente estudo, a trombocitopenia verificada no grupo controle pode indicar contribuição das cepas probióticas na regulação da formação de plaquetas na sepse, influenciando positivamente na atenuação do processo hemorrágico.

Outras importantes variáveis para a avaliação da saúde e bem-estar dos peixes são os níveis das enzimas AST e ALT, ambas produzidas no fígado. Valores elevados podem indicar danos hepáticos, sendo a disfunção hepática uma característica muito comum observada no processo séptico em teleósteos (CLAUDIANO et al., 2019). No presente estudo, todos os grupos suplementados apresentaram níveis mais reduzidos de AST e ALT, indicando que a inclusão de dieta suplementada com as cepas M14 e I10 contribuíram para amenizar danos hepatocelulares em tambaquis, causados pela aeromonose. Além disso, o aumento dos níveis séricos de triglicerídeos, associado a redução dos valores de AST e ALT, reforça a hipótese de menor lesão hepática nos peixes, possivelmente pelos triglicerídeos promoverem uma redução da peroxidação lipídica (ALMEIDA, 2011).

Quanto aos demais achados neste estudo em relação ao perfil bioquímico sérico que incluem fosfatase alcalina, glicose, proteínas totais, albumina, globulinas e colesterol, os dados obtidos corroboram com os achados na literatura acerca da resposta durante o processo séptico em peixes e mamíferos (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2018; CLAUDIANO et al., 2019). Esses dados indicam que as suplementações probióticas fornecidas não influenciaram melhorias nestes parâmetros durante a evolução da sepse.

A atividade de respiração leucocitária não divergiu entre os peixes dos tratamentos deste estudo, corroborando aos achados em trutas arco-íris suplementadas com probióticos comerciais multiespécies (*Bacillus sp.*, *Pedococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*) e monoespécies, *Pedococcus acidilactici*, sem infecção (RAMOS et al. 2015). Noff et al. (2015) constataram que juvenis de robalo alimentados com *B. subtilis* apresentaram maior atividade de respiração

leucocitária após sete dias de suplementação, com redução da atividade nos dias subsequentes. Estes achados contribuem para o entendimento da ausência de diferença nos níveis encontrados para tambaqui no presente estudo, mostrando que as cepas probióticas utilizadas não exerceram influência sobre as ERO e/ou durante o desenvolvimento da sepse, provavelmente por conta da não alteração na contagem de granulócitos, uma vez que são moléculas produzidas pelos neutrófilos. .

A concentração de lisozima foi maior para os grupos que receberam dieta suplementada em comparação ao grupo controle, com maior concentração observada no grupo I10 3x, corroborando com os verificados em botias de lagoa *Misgurnus anguillicaudatus*, suplementadas com *Lactobacillus helveticus* (YANG et al., 2021). Em contraste com os resultados obtidos neste estudo, não foram verificadas alterações na concentração de lisozima em tilápias-do-nilo que receberam dieta suplementada com *B.subtilis* e *Bacillus licheniformis* (TELLI, 2017). Como evidenciado, foi possível constatar que a dieta suplementada influenciou positivamente na produção de lisozima encontrada no soro dos tambaquis, com melhores respostas observadas nos grupos suplementados com a cepa I10. As diferenças encontradas na literatura podem ser devido a escolha do probiótico, a concentração, a forma de inclusão na dieta, idade e espécie estirpe / tamanho do peixe e o tempo duração do experimento. Outros fatores como as condições ambientais, práticas de manejo e densidades de estocagem também podem afetar os resultados.

Os peixes que receberam a dieta suplementada com os probióticos apenas 1 x ao dia apresentaram maiores níveis da enzima mieloperoxidase após a indução da sepse. Resultados similares foram observados em peixes com suplementação de vitaminas e óleos essenciais (DA ROSA, 2019; MORI et al., 2019). O aumento da atividade da MPO representa uma condição essencial na imunidade uma vez que esta enzima desempenha importante papel na atividade das ERO, atuando na destruição de antígenos invasores.

As amostras séricas coletadas 24 horas após o desafio com *A. hydrophila* permitiram constatar que a aglutinação bacteriana foi superior para os peixes suplementados com a cepa M14, especialmente aqueles que receberam a ração suplementada nas 3 alimentações. Desta forma, pode-se presumir que estes grupos apresentaram maiores níveis de anticorpos naturais, resultando em maior aglutinação

contra a bactéria patogênica, tendo sua produção estimulada pela cepa probiótica utilizada, provavelmente decorrente da maior diversidade e exposição da microbiota intestinal. Este é um fator importante pois o título elevado está associado com maior opsonização, implicando em menor resposta celular e resultando em melhor proteção e menor gasto de energia. Esta correlação pode ser evidenciada pela maior concentração de lisozima sérica observada nos peixes do grupo I10, enquanto os mesmos grupos apresentaram menores títulos de anticorpos naturais, ou seja, com menor produção de anticorpos, foi necessário maior atividade das células de defesa para combater a bactéria patogênica. Portanto, os dados obtidos no presente estudo apontam benefícios da utilização de cepas autóctones na produção de anticorpos em tambaquis.

A inclusão de probióticos na dieta estimula um balanço de bactérias benéficas no trato gastrointestinal (TGI), contribuindo para a melhor imunomodulação dos tambaquis suplementados com probióticos autóctones, conforme verificado pela melhora do quadro clínico e da resposta imune inata dos peixes (TORRES-FUENTES et al., 2015; CHAUHAN e SINGH, 2018; TACHIBANA et al., 2019). Os peixes suplementados apresentaram uma abundância maior de bactérias benéficas, a exemplo de *Cetobacterium somerae*, descrita com potencialidades probióticas (XIE et al., 2021; GÓMEZ et al., 2023; QI et al., 2023; ZHANG et al., 2023), elucidando a capacidade das bactérias ácido-lácticas com perfil probiótico administrado de fornecer um balanço destas comunidades bacterianas ao hospedeiro. Apesar disso, *Lactobacillus* sp. não foi encontrada em grande abundância no sequenciamento. Um dos prováveis motivos pode ser a concentração administrada, sendo insuficiente para colonizar o TGI e / ou o fato de que peixes de criação apresentam naturalmente uma diversidade microbiana muito baixa de *Lactobacillus* sp., conforme verificado em tentativas iniciais de isolamento pelo grupo de pesquisa. Ainda assim, mesmo que enquadradas como transitórias, estas bactérias foram capazes de interagir com a microbiota benéfica residente, auxiliando na melhora da resposta imune e na maior diversidade bacteriana no trato intestinal dos tambaquis suplementados.

Em contrapartida, a abundância de outros gêneros patogênicos como *Enterobacter* e *Citrobacter*, verificados em todos grupos experimentais, possivelmente se deve ao fato de que a sepse provocada por *A. hydrophila* comprometeu o organismo dos peixes, provocando disbiose e tornando-os suscetíveis a uma maior

diversidade de microrganismos patogênicos oportunistas que já se encontravam *a priori* no trato gastrintestinal dos animais, bem como na própria água de criação, podendo ter ocorrido ainda uma possível contaminação cruzada. A razão destes microrganismos também terem sido visualizados em maior abundância nos grupos que receberam dieta suplementada com os probióticos pode estar vinculada à capacidade destes patógenos em produzir biofilmes (ROCA et al., 2009; WADA et al., 2010; SOARES et al., 2016), os tornando menos suscetíveis às atividades antimicrobianas das cepas utilizadas.

Os resultados obtidos demonstram que bactérias autóctones podem ser uma importante estratégia profilática na piscicultura uma vez que são capazes de interagir de forma segura com a microbiota residente e estimular o sistema imunológico seja por uma melhora na resposta celular (I10) ou humoral (M14). Apesar de no presente estudo a origem das cepas ter apresentado mudanças mais notáveis nestas respostas, a frequência alimentar é outro fator que também pode contribuir para este parâmetro. Entretanto, a pouca variação na frequência de administração dos probióticos não apresentou diferenças notáveis neste aspecto.

De modo geral, todos os grupos suplementados com os probióticos apresentaram melhoras nas respostas frente à infecção por *A. hydrophila*. Esses dados podem contribuir para o melhor entendimento acerca da contribuição de cepas autóctones para a imunidade dos peixes, principalmente em condições graves como a sepse para o *C. macropomum*.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização dos probióticos autóctones na dieta de *C. macropomum*, especialmente as formuladas com a cepa M14, provocou melhora na resposta imune dos peixes frente ao desafio com *A. hydrophila*, demonstrando o seu potencial de utilização para melhor manutenção da saúde desta espécie na piscicultura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD, A.; SALAH. M.; HAIDY, G.; FATMA, M. A.; FATMA, K. A. Effect of some immunostimulants on Clinicopathological Findings of African Catfish *Clarias gariepinus*

infected with motile *Aeromonas septicemia*". **EC Veterinary Science**, v. 4, p. 498-510, 2019.

AKHTER, N., WU, B., MEMON, A. M.; MOHSIN, M. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 733-741, 2015.

ALMEIDA, B. B. Ações do óleo de peixe e triglicerídeos de cadeia média na esteatose hepática e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos. 2011. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011. DOI:10.11606/D.17.2011.tde-22112011-102759. Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.

ALONSO, S., CASTRO, M., BERDASCO, M., DE LA BANDA, I. MORENO-VENTAS, X. AND DE ROJAS, A. Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 569-579, 2019.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**., v. 215, n. 3, p. 403-410,1990.

ALY, S. M.; AHMED, Y. A.; GHAREEB, A. A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, 2008. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.03.013.

ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic hematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J. R.; SUBASINGLE, R. P. (Ed.). Diseases in Asian Aquaculture II. Manilla: **Fish Health Section, Asian Fisheries Society**, p. 185-202. 1995.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso em: 12 de dezembro de 2023.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 640, n. 15, p. 47–52, 2018. DOI: 10.1016/j.abb.2018.01.004.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish**. 5ª edição, pp. 119-228 Springer, 2012.

AZEVEDO, R. V.; FILHO, J. C.; PEREIRA, S. L.; CARDOSO, L. D.; ANDRADE, D. R.; JUNIOR, M. V. Dietary mannan oligosaccharide and *Bacillus subtilis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá**, v. 38, n. 4, p. 347-353, 2016.

AZEVEDO, R. V et al. Suplementação com prebiótico, probiótico e simbiótico para juvenis de tambaqui a duas densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.1, p.9-16, 2016.

BALDRIDGE, C. W.; GERARD, R. W. "The extra respiration of phagocytosis." **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 103, n. 1, p. 235–236, 1932. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1932.103.1.235>.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. **Veterinary Science**, 2017.

BARBIERI, E.; BONDIOLI, A. C. V. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. **Aquaculture Research**, v. 46, n.3, p. 565-571, 2013.

BARBOSA, L. M. G. Avaliação de respostas metabólicas e de imunidade inata em pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com vitamin E e submetidos à variação de temperatura. 2011. 122 f. Dissertação – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

BARROS, F. A. L.; SILVA, L. A.; DIAS, J. A. R; ABE, H. A.; PAIXÃO, P. E. G; SOUSA, N. C.; CORDEIRO, C. A. M.; FUJIMOTO, R. Y. Seleção in vitro de bactéria autóctone com potencial probiótico para o peixe neotropical piauçu *Megalaporinus microcephalus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 74, n. 2, pág. 327-337, 2022.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; SAITA, M. V.; GIMBO, R. Y.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, p. 425-429, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; URBINATI, E.C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. Anais da Academia Brasileira de Ciência, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1484-1506, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. Disease of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β -glucan. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n.3, p.698-703, 2014.

BOECHAT, T. O.; SILVEIRA, M. F. B. B.; FAVIERE, W.; MACEDO, G. L. Thrombocitopenia in sepsis: an important prognosis fator. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2012000100006>

BOWDEN, T.J.; COOK, P.; ROMBOUT, J.H.W.M. Development and function of the thymus in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, v.19, p.413-427, 2015.

BUGLIONE-NETO, C.; MOURIÑO, J. L.; VIEIRA, F. N.; SILVA, B. C.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W.; FRACALOSSO, D. M.; ANDREATTA, E. Métodos para determinação da digestibilidade aparente de dietas para camarão marinho suplementadas com probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.8, p.1021-102, 2013 DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800030>.

CAMPOS, R., BORTOTI, A. A., STECLAN, C. A., PAWLOWYTSCH, P. W. DA M., VALÉRIO, M. C. J., PALUCH, C. H., & FERNANDES, L. C. (2020). Efeito da suplementação com óleo de peixe no modelo experimental de sepse. **Revista Contexto & Saúde**, 20 (39), 27–34. . DOI: <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2020.39.27-34>.

CANDIDO, T. D.; NETO, F. J.; MARUCIO, R. L.; FRAZÍLIO, F. O. Medvep - **Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 10, n. 32, p. 128-132, 2012.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal.**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012. PMID: 22402401; PMCID: PMC3400413. DOI: 10.1038/ismej.2012.8.

CARDOSO, N. A.; BRAGA SOBRINHO, C. Fluidoterapia nos pacientes em choque séptico: revisão de literatura Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e ootecnia do CRMV-SP / Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 16, n. 1, p. 22-28, 2018.

CASCIARO, M et al. Chlorinative stress in age-related diseases: a literature review. **Immunity & Ageing**, v. 14, n. 21, p. 1-7, 2017. DOI: 10.1186/s12979-017-0104-5.

CASTRO, M. P.; CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T. R.; SHIMADA, M. T.; BELO, M. A. A.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; MORAES, J. R. E.; MANRIQUE, W. G.; MORAES, F. R. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, n. 284-290, 2014.

CAVALCANTE, R. B. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: Growth performance T and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. **Reviews in Aquaculture**, 2020.

CHAUHAN, A.; SINGH, R. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. **Symbiosis**. v. 77, n. 23, p. 1-15, 2018.

CHEN, H.; YUAN, G.; SU, J.; LIU, X. Hematological and immune genes responses in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with septicemia induced by *Edwardsiella ictaluri*, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 97, p. 531-539, 2020, ISSN 1050-4648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.071>.

CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T. R.; MANRIQUE, W. G.; MARCUSSO, P. F.; Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, p. 01-06, 2013.

CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARINHO-NETO, F. A.; MIRANDA, R. L.; MARTINS, I. M.; OTANI, F. S.; MUNDIM, A.V.; MARZOCCHIMACHADO C. M.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Hematological and immune changes in *Piaractus*

mesopotamicus in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 259- 265, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.044>.

COCK, P. J. A.; ANTAO, T.; CHANG, J.T.; CHAPMAN, B.A.; COX, C.J.; DALKE, A.; FRIEDBERG, I.; HAMELRYCK, T.; KAUFF, F.; WILCZYNSKI, B.; HOON, M.J.L. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1422–1423, 2009.

CORDERO, H., CUESTA, A., MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. Á. Changes in the levels of humoral immune activities after storage of gilthead seabream (*Sparus aurata*) skin mucus. **Fish & Shellfish Immunology**. 58, 500-507, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.059>.

CORNÉLIO, J. P.; CORNÉLIO, K. C. A influência do uso de probióticos no desempenho e saúde de peixes nativos: uma revisão narrativa. **Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências E Educação**, v. 1, n. 2, p. 39–47, 2024. DOI: <https://doi.org/10.51891/rease.v1i2.10726>.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals by probiotic *Lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens. **Immunology Medicine Microbiology**, v. 34, n.4, p. 245– 253, 2022.

DA ROSA, V. M. Efeito da dieta contendo rutina sobre a inflamação, apoptose e a resposta antioxidante em jundiás (*Rhamdia quelen*) infectados com *Aeromonas hydrophila*. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, 2019.

DEFOIRD, T. Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 2, p. 100-114, 2013.

DEGASPERI, G. R.; MARQUES, M. J.; JUNCKER, A.; MARTIN, I. Mitocôndrias no cenário da resposta imune inata exercida por macrófagos. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, vol. 11 (10), e569, 2019. ISSN 2178-2091. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e569.2019>.

DESANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.L., KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D. HU, P.; ANDERSEN, G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-72, 2006. DOI: 10.1128/AEM.03006-05. PMID: 16820507; PMCID: PMC1489311.

DIAS, J. A. R.; ALVES, L. L.; COUTO, M. V. S.; BARROS, F. A. L.; CORDEIRO, C. A. M.; PAIXAO, P. E. G.; FUJIMOTO, R. Y. Inflammatory response in swim bladder caused by *Aeromonas hydrophila* in tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816) supplemented with an autochthonous probiotic (*Bacillus cereus*). **Aquaculture Research**, v.1, p. 1-7, 2021. DOI: 10.1111/are.15490.

DIAS, J. A.; ABE, H. A.; SOUSA, N. C.; COUTO, M. V.; CORDEIRO, C. A.; MENESES, J. O.; CUNHA, F. S.; MOURIÑO, J. L.; MARTINS, M. L.; BARBAS, L. A. L.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, N. A.; FUJIMOTO, R. Y. Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* improves growth performance and survival in tambaqui *Colossoma macropomum*. **Aquaculture Research**, v. 49, p. 3063 - 3070, 2018.

DIAS, J. A. R.; ALVES, L. L.; BARROS, F. A. L. et al. Comparative effects of using a single strain probiotic and multi-strain probiotic on the productive performance and disease resistance in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 550, 2022. ISSN 0044-8486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737855>.

DOS SANTOS, T. M. Prospecção e uso de probióticos autóctone isolados do intestino de *Colossoma Macropomum* no desempenho zootécnico e na profilaxia da aeromonose na larvicultura de tambaqui. 2023. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, 2023.

ELLIS, A. E. Lysozyme assays. In: Stolen, J. S.; Fletcher, T. C.; Anderson, D. P.; Roberson, B. S.; Muiswinkel, W. B. (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications, p. 101-103, 1990.

ETO, S. F.; FERNANDES, M. C.; MARINHO-NETO, F. A.; PIZAURO, J. M.; SALVADOR, R.; MORAES, J. R.; MORAES, F. R. Ativação de células de memória na produção de anticorpos e na expressão de células IgM positivas no baço de tilápias-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.1, p.205-212, 2018.

FARAMARZI, M.; KIAALVANDI, S.; LASHKARBOLOOKI, M.; IRANSHAHI, F. The investigations of *Lactobacillus acidophilis* as probiotics on grown performance and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **American – Eurasian Journal of Scientific Research**, v. 6, n. 1, p. 32-38, 2011.

FARIAS, T. H. V.; LEVY-PEREIRA, N.; ALVES, L. O.; DIAS, D. C.; TACHIBANA, L.; PILARSKI, F.; BELO, M. A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 137-144, 2016. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2015.11.004.

FERIA, M. G.; TABORDA, N. A.; HERNANDEZ, J. C.; RUGELES, M. T. Efecto de la terapia com probióticos/prebióticos sobre la recon stitución del tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal durante la infección por el vírus dela inmunodeficiencia humana. **Revista Médica De Chile**, v. 145, p.219– 229, 2017.

FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; CLAUDIANO, G. S. et al. Humoral immune response of *Oreochromis niloticus*: modified direct agglutination test. **Comp. Clin. Pathol.**, v.24, p.617-623, 2015.

FERRAREZI, J. V. Efeitos da suplementação dietária com *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na microbiota e saúde intestinal da tilápia-do-nilo. 2021. 44 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2021.

FERREIRA, A. H. C.; LOPES, J. B.; ARARIPE, M. N. B. A.; MONTEIRO, C. A. B.; ANDRADE, F. T. Probiotic addition effect assessment in the diet of fingerling and juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) created in treated sewage. **Eng Sanit Ambient**, v. 23, n. 4, p. 665-674, 2018. DOI 10.1590/S1413-41522018134833.

GENG, X.; DONG, X.H.; TAN, B.P.; YANG, Q.H.; CHI, S.Y.; LIU, H.Y.; LIU, X.Q. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish Shellfish Immunol**, Oxford, p. 400-406, 2012.

GHOMRASSI, H., BEN BRAIEK, O., CHOISSET, Y., HAERTLÉ, T., HANI, K., CHOBERT, J.M., GHRAIRI, T. Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fish-pathogenic Gram-negative bacteria. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 118, p. 31-43, 2016.

GOMES, L. G. O.; FODRA, J. D.; MASSABNI, A. C. Hematologia dos vertebrados: a série vermelha do sangue. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, n.3, 2021.

GÓMEZ, M. A. C.; MELO-BOLÍVAR, J. F.; PARDO, R. Y. R. RODRIGUEZ, J. A.; VILAMIL, L. M. Unveiling the probiotic potential of the anaerobic bacterium *Cetobacterium* sp. nov. C33 for Enhancing Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultures. **Microorganisms** v. 11, n.12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122922>.

HAI, N. V. Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: a review. **Fish Shellfish Immunology**, v. 45, p. 592-597, 2015.

HARIKRISHNAN, R.; NISHA M.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection, **Aquaculture**, v. 221, p. 41-50 2003. ISSN 0044-8486. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00023-1).

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G., MERENSTEIN, D., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R., FLINT, H. SALMINEN, S., CALDER, P. SANDERS, M., The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Gastroenterology & Hepatology: Nature reviews**, 11: 506-514, 2014.

HRUBE, T. C.; SMITH, S. A. 1998. Hematology of fish, p. 1120 1125. in: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (ed.). Schalm's Veterinary Hematology. 5° ed. Blackburg: Wiley-Blackwell.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 182-8, 2011. Epub 2010 Apr 9. PMID: 20382054. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.03.003.

JATOBÁ, A., VIEIRA, F. D. N., NETO, C. B., SILVA, B. C., MOURINO, J. L. P., JERONIMO, G. T., MARTINS, M. L. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesqui. Agropecu. Bras.** 43, 1201–1207, 2008. DOI: 10.1590/S0100-204X20080009000150.

JATOBÁ, A.; MORAES, A. V.; STECKERT, L. D.; JESUS, G. F. A. Selection of autochthone probiotic for *Astyanax bimaculatus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 1645-1652, 2017.

JATOBÁ, A.; MORAES, K. N.; RODRIGUES, E. F.; VIEIRA, L. M.; PEREIRA, M. O. Frequency in the supply of *Lactobacillus* influence its probiotic effect for yellow tail lambari. **Ciência Rural**, v.48:10, 2018. ISSN 1678-4596 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180042>.

JATOBÁ, A.; PEREIRA, M. O.; RODRIGUES, J. C. B. Hematological profile of *Astyanax bimaculatus* under different offer of *Lactobacillus* sp. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.72, n.3, p.871-878, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10832>.

JUNCAL, V. R.; NETO, L. A. B.; CAMELIER, A. A.; MESSEDER, O. H. C.; FARIAS, A. M. C. Clinical impact of sepsis at admission to the ICU of a private hospital in Salvador, Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 37, n. 1, p. 85-92, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132011000100013>.

KHAN, A; ALSAHLI, M; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. **Medical Sciences (Basel)**, v. 33, n. 6, p. 01-21, 2018. DOI: 10.3390/medsci6020033.

KOCH, M. S.; DREWNOWSK, B.; BUENO, B. F.; RICKLI, C.; NOVAK, R. S.; VELLOSA, J. C. R.; General aspects of Myeloperoxidase and its involvement in diseases: a brief review. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.3, 2021. ISSN: 2525-8761. DOI:10.34117/bjdv7n3-536.

LEÃO, S. O. A.; SILVA, A. M. S.; VELASQUEZ, J. G. R.; BRANDÃO, F.; CHAGAS E. C.; MAJOLA, C. Ocorrência de *Aeromonas* multirresistentes em tambaquis cultivados em tanques escavados. **Scientia Amazonia**, v.9, n.4, CA17-CA24, 2020. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1126835/1/v9-n4-CA17-CA24-2020.pdf>> Acesso em 01 de março de 2023.

LIMA, V. C. F.; OLIVEIRA, A. S.; MOREIRA, D. K. T.; SILVA, A. S. L.; SILVA, A. C. F.; CLAUDIANO, G. S. Alterações morfológicas de leucócitos e trombócitos sanguíneos em *Piaractus mesopotamicus* durante a sepse. **Revista Agroecossistemas**, v. 11, ed. 2, p. 137-144, 2019. DOI 10.18542/ragros.v11i2.8962.

LIMA, V. M. M.; JUNIOR, A. F.; SCHEDT, G. N.; SILVA, E. C.; PORTELLA, A. C. 2018. Probiotics in Aquaculture Review: Current Status and Application in Tambaqui Cultivation (*Colossoma macropomum*). **International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)** v. 5, n. 5, 2018. ISSN: 2349-6495(P) | 2456-1908(O). DOI: <https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.5.5.4>.

LIU, X. F.; LI, Y.; LI, J. R.; CAI, L.Y.; LI, X. X.; CHEN, J. R.; LYU, S. X. Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 795-803, 2015.

LOPES, G. R.; OLIVEIRA, H. M.; JESUS, G. F.; MARTINS, M. L.; GOMES, C. H.; SOLIGO, T.; MOURIÑO, J. L. Biological strategy to improve decomposition of organic matter in tilapia pond. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 32, e27, 2020.

MARCUSSO, P. F.; CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARINHO-NETO, F., A.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; ROSOLEM, M. C.; SALVADOR, R.; MORAES J. R. E.; MORAES, F. R. Imunogenicidade em *Oreochromis niloticus* vacinado com antígenos sonicados contra estreptococose. **Peixe Marisco Immunol.**, v. 115, p. 134-141, 2021. PMID: 34098067. DOI: 10.1016/j.fsi.2021.04.030.

MARENGONI, N. G.; ALBUQUERQUE, D. M.; BESEN, M. A.; WEISS, L. A. Hematological and biochemical profile and parasite prevalence in Nile tilapia fed dietary probiotics. **Revista Agrarian**, v.12, n.46, p.503-513, 2019. ISSN: 1984-2538 503.

MARINHO-NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVAQUIROZ, V. A.; KOBASHIGAWA, K. K.; CRUZ, N. R.; MORAES, J. R. Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. PloS one, v. 14, n. 9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222626>.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; POLIZELLO, A.C.; AZZOLINI, A.E.; LUCISANO VALIM, Y.M. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes antiBSA IgG/ BSA. **Immunological Investigations**, v. 28, p. 89-101, 1999.

MASELLA, A.P., BARTRAM, A.K., TRUSZKOWSKI, J.M. et al. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **BMC Bioinformatics** **13**, 31 (2012). DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>.

MELLO, H.; MORAES, J. R. E.; NIZA, I. G.; MORAES, F. R.; OZÓRIO, R. O. A.; SHIMADA, M. T.; FILHO, J. R. E.; CLAUDIANO, G. S. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 6, p. 724-730, 2013.

MENDONÇA, P. P., VIDAL, M. V. J., POLESE, M. F., SANTOS, M. V. B., REZENDE, F. P. AND ANDRADE, D. R. Morphometrical development of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) under different photoperiods. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 41, n. 6, 2012.

MERRIFIELD, D.; RINGO, E. (Edit) Gut health, probiotics and prebiotics. **Aquaculture Nutrition**, Wiley-Blackwell, p. 128-168, 2014.

MORI, N. C.; MICHELOTTI, B. T.; PÊS, T. S.; BRESSAN, C. A.; SUTILI, F.; KREUTZ, L. C.; GARLET, Q.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; CERQUEIRA, V. R.; DA COSTA, S. T.; HEINZMANN, B. M. Citral as a dietary additive for *Centropomus undecimalis* juveniles: Redox, immune innate profiles, liver enzymes and histopathology. **Aquaculture**, v. 501, p. 14-21, 2019. ISSN 0044-8486 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.003>.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; Silva, B. C.; Vieira, F. N.; MARTINS, M. L. Probióticos na aquicultura. In: SOUZA, Ângela Teresa; LIZAMA, Maria De Los Angeles; TAKEMOTO, Ricardo. (Org.). **Patologia e sanidade de organismos aquáticos**. 1ed. MARINGÁ, PR: ABRAPOA, v. 1, p. 381-404, 2012.

MOURIÑO, J. L. P., VIEIRA, F. N., JATOBÁ, A., SILVA, B. C., PEREIRA, G. V., JESUS, G. F. A., USHIZIMA, T. T., SEIFFERT, W. Q., MARTINS, M. L. Symbiotic supplementation on the hematoimmunological parameters and survival of the hybrid surubim after challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Aquac. Nutr.** 23, 276–284, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12390>.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of chickens. *Poultry Science*, v.31, p.182-8, 1952.

NDUKA, O.; PARRILLO, J.E. The Pathophysiology of Septic Shock. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 23, p. 41–66, 2011.

NEVES, M. S.; COUTO, M. V. S.; SOUSA, N. C.; SANTOS, R. F. B.; DIAS, H. M.; ABE, H. A.; DIAS, J. A. R.; CUNHA, F. S.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y. Hematological response of Amazonian ornamental *Peckoltia oligospila* subjected to stress by Transportation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.70, n.1, p.13-19, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9471>.

NOFFS, A. P.; TACHIBANA, L.; SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Common snook fed in alternate and continuous regimens with diet supplemented with *Bacillus subtilis* probiotic. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.50, n.4, p.267-272, 2015 DOI: 10.1590/S0100-204X2015000400001.

OLINDA, R. G.; FEIJÓ, M. C.; BATISTA, J. S.; LIMAS, J. T. Isolamento de *Alcaligenes faecalis* em peixe *Betta splendens* Regan, 1910 no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.4, p. 360-362, 2014.

PÁDUA, S.B.; PILARSKI, F.; NETO, J.D.; ISHIKAWA, M.M.; SATAKE, F.; TAVARES-DIAS, M. Morphologic disorders in leukocytes of goldfish sample (*Carassius auratus auratus* Linnaeus, 1758) with bacterial hemorrhagic septicemia: case report. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 16-20, 2010.

PAIXÃO, P. E. G.; COUTO, M. V. S.; SOUSA, N. C. et al. Autochthonous bacterium *Lactobacillus plantarum* as probiotic supplementation for productive performance and sanitary improvements on clownfish *Amphiprion ocellaris*. **Aquaculture**, v. 526, 2020. ISSN 0044-8486. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735395>.

PEIXOTO, L. J.; SÁ, M. C.; GORDIANO, L. A.; COSTA, M. M. *Aeromonas* spp.: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.3, p.453-461, 2012.

PEREIRA, D. S. P.; GUERRA-SANTOS, B.; MEDEIRAS, S. D. C.; ALBINATI, R. C. B.; AYRES, M. C. C. Comparison of methodologies used in the analysis of parameters of blood and total protein of Nile tilapia (“*Oreochromis niloticus*”). **Rev. Bras. Saúde**

Prod. Anim., v. 16, n. 4, p. 893-904, 2015. ISSN 1519 9940 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402015000400013>.

PEREIRA, D. S. P.; GUERRA-SANTOS, B.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; AYRES, M. C. C. Parâmetros hematológicos e histológicos de tilápia do nilo em resposta ao desafio de diferentes níveis de salinidade. **Bol. Inst. Pesca**, v. 42, n. 3, p. 635-647, 2016 DOI: 10.20950/1678-2305.2016v42n3p635.

PEREIRA, G.V et al. Autochthonous probiotic bacteria modulate intestinal microbiota of Pirarucu, *Arapaima gigas*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.50, p. 1–16, 2019.

PEREIRA, S. A.; JESUS, G. F. A.; PEREIRA, G. V.; SILVA, B. C.; SÁ, L. S.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P. the chelating mineral on organic acid salts modulates the dynamics and richness of the intestinal microbiota of a silver catfish *Rhamdia quelen*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 1483-1495, 2020.

PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P. H. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. **CAB Reviews**, v. 7, p. 1-16, 2012.

QUADE, M. J.; ROTH, J. A. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 58, p. 239-248, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(97)00048-2).

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Res.** 2013. (Database issue):D590-6. PMID: 23193283; PMCID: PMC3531112. DOI: 10.1093/nar/gks1219.

QI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LUO, F.; SONG, K.; WANG, G.; LING, F. Vitamin B₁₂ produced by *Cetobacterium somerae* improves host resistance against pathogen infection through strengthening the interactions within gut microbiota. **Microbiome**, v. 15, n.11, p. 135, 2023. PMID: 37322528; PMCID: PMC10268390. DOI: 10.1186/s40168-023-01574-2.

RABELO, R. C. Emergências de pequenos animais: condutas clínicas e cirúrgicas no paciente grave. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAMOS, M. A.; GONÇALVES, J. F.; BATISTA, S.; COSTAS, B.; PIRES, M. A.; REMA, P.; OZÓRIO, R. O. Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. **Fish Shellfish Immunol.**, v., 45, n. 1, p. 19-26, 2015. PMID: 25865055. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.04.001.

REIS NETO, R. V. Avaliação genética das características morfológicas de tilápias do Nilo, variedade GIFT, sob seleção para ganho em peso. 2012. 77 f. Tese (Doutorado em Zootecnia), Departamento de Produção Animal, Universidade Federal de Lavras, 2012.

RINCÓN V. G.; FUENMAYOR B. A.; CASTELLANO G. M.; BARRIOS U. R.; COLINA C. M.; NUÑEZ F. G. Factores de Virulencia en Cepas de *Aeromonas* spp. **Kasmera**, v. 44, n. 2, 121-133, 2016.

RINGO, E.; VAN DOAN, H.; LEE, S. H.; SOLTANI, M.; HOSEINIFAR, S. H.; HARIKRISHNAN, R.; SONG, S. K. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 116-136, 2020.

ROCA, D. A. L.; ROCA, L. M. L.; HUAMÁN E. M. Padrão de suscetibilidade antimicrobiana de *Enterobacter* ssp. isolada de infecções urinárias em pacientes ambulatoriais em um hospital da cidade de Lima, Peru. **Perspectivas Médicas**, v. 20, n. 2, 2009.

RODRIGUES, G. M.; NASCIMENTO, F. G. O.; BIZARE, A.; OLIVEIRA, W. J.; GUIMARÃES, E. C.; MUNDIM, A. V. Serum biochemical profile of Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*) bred in net cages during summer and winter. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, 2018. ISSN 1679-9216.

RODRIGUES, F. S.; CHAGAS, S. R.; ROCHA, M. C. V.; NASCENTE, E. de P.; PAULA, F. G.; PASCOAL, L. M. Innate immune system and the use of garlic as an immunostimulant: literature review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. e152943014, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i4.3014>. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/3014>> Acesso em: 05 de março de 2023.

ROSS L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative techniques for Aquatic Animals**. 2ª ed. London: Willey-Blackwell Publishing; 2008.

RUIZ, M. L.; OWATARI, M. S.; YAMASHITA, M. M.; FERRAREZI, J. V. S.; GARCIA, P.; CARDOSO, L.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P. Histological effects on the kidney, spleen, and liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed different concentrations of probiotic *Lactobacillus plantarum*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 1, p. 167-176, 2019.

SATO, L. Y. Utilização de microrganismos isolados de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) como probiótico em peixes. 2019. 42f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA) – Instituto de Pesca (APTA – SAA), São Paulo, 2019. f. 42.

SCHWARZ, K. K.; FURUYA W. M.; NATALI, M. R. M.; MICHELATO, M.; GUALDEZI M. C. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de Tilápias-do-Nilo. **Acta Scient., Anim. Sci**, v. 32, n.2, p. 197-203, 2010.

SILVA, T. D. Duração do efeito imunoestimulante da glucana pós administração em pacu. 2021. 50 F. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP/CAUNESP, Jaboticabal, 2021.

SHANKAR-HARI, M.; PHILLIPS, G. S.; LEVY, M. L.; SEYMOUR, W.; LIU, V. X.; DEUTSCHMAN, C. S.; ANGUS, D. C.; RUBENFELD, G. D.; SINGER, M. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third

International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016.

SILVA, C. A.; FUJIMOTO, R.Y. Crescimento de tambaqui em resposta a densidade de estocagem em tanques-rede. **Acta Amazonica**, v. 43, p. 323-332, 2015.

SILVA, A.F.C.; FONSECA, J.R.S.; CARVALHO, K.V.; VIEIRA, R.A.R.; FREITAS, K.F.S.; CASTRO, V.S.; SIGNOR, A.A. Inclusion of probiotic additives in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its effects on performance, hematological, hepatic and intestinal parameters. **Research, Society and Development**, v.10, n.8, 2021.

SILVA, A. A.; LEITE, J. N.; WINTER, H. C.; FURTADO, T. L.; MORAIS, N. M.; FARIA, R. A.; NASCIMENTO, E. LANZARIN, D. O. *Aeromonas* sp. in freshwater fish and antimicrobial resistance: emerging pathogen. **Ciência Rural**, v.53, n.7, 2023. SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; VELASCO, C. M.; ARAUJO, J. N.; VITORINO, R. R.; ROQUE-RINCO, U. G.; FREITAS, B. A.; BRESSAN, J. Nutritional support in sepsis. **Rev. Bras Clin. Med.**, v. 10, n. 5, p. 420-426, 2012.

SINGER, M. et al. The hird International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SMYTH, R. P. et al. Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. **Gene**, v. 469, p. 45–51, 2010.

SOARES, G. G.; COSTA, J. F.; MELO, F. B. S.; MOLA, R.; BALBINO, T. C. L. Biofilm production and resistance profile of *Enterobacter* sp. strains isolated from pressure ulcers in Petrolina, Pernambuco, Brazil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 52, n. 5, p. 293-298, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160045>.

SOUSA, N. C.; COUTO, M. V. S.; ABE, H. A.; PAIXÃO, P. E. G.; CORDEIRO, C. A. M.; MONTEIRO-LOPES, E.; READY, J. R.; JESUS, G. F. A.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J. L. P.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N.; FUJIMOTO, R. Y. Effects of an *Enterococcus faecium* based probiotic on growth performance and health of Pirarucu, *Arapaima gigas*. **Aquaculture Research**, v. 50, p. 3720-3728, 2019.

STANDEN, B. T.; PGGS, D. L.; RAWLING, M. D. et al. Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish Shellfish Immunol.**, v.49, p.427-435, 2016.

STOSKOPF, M.K. (Ed.) Fish Medicine. England: Saunders, 1993. 882p.

TACHIBANA L.; NATORI, M. M.; DIAS, D. C.; HAMED, S. B.; ISHIKAWA, C. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; GONÇALVES, G. S. Recentes avanços dos estudos e utilizações de probióticos na piscicultura. In: RANZANI-PAIVA, Maria José Tavares et al (Org.). **Biotechnologia e sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Associação de Patologistas de Organismos Aquáticos (ABRAPOA), cap. 2. p. 41-80, 2019.

TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A. A.; MARCON, J.L. Methodological limitations of counting total leukocytes and thrombocytes in reptiles (Amazon turtle,

Podocnemis expansa): an analysis and discussion. **Acta Amazonica**, v. 38, n 2, p. 351-356, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**, v. 1. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. 429p. ISBN. 978-85-7993-271-7.

TELLI, G. S. *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* na alimentação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*: desempenho zootécnico, sanidade e modulação da microbiota intestinal. 2017. 62f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, 2017.

TOMÁS, J. M. The main *Aeromonas* pathogenic factors. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 01-22, 2012.

TORRES-FUENTES, C. et al. A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. **Nutritional Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 49–65, 2015.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni medicina**, v. 56, n. 10, p. 486, 2011.

VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, P. A.; SOARES, M.; SILVA, B. C.; SEIFFERT, W. Q.; MARTINS, M. L.; VINATEA, L. A. *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 998-1004, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800027>.

VOSYLIENĖ, M.Z., The effects of heavy metals on haematological indices of fish (Survey). **Acta Zoologica Lituanica**, v. 9, p.76-82, 1999.

WADA, A.; TEIXEIRA NETO, N.; FERREIRA, M. C. Úlceras por pressão. **Revista De Medicina**, v. 89, p. 170-177, 2010. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v89i3/4p170-177>.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS One**, v. 4, n. 10, 2009. PMID: 19816594; PMCID: PMC2754607. DOI: 10.1371/journal.pone.0007401.

WEDEMEYER G, ROSS AJ, SMITH L. Some metabolic effects of bacterial endotoxin in salmonid fishes. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, v. 26, n.1, p. 115-122. 1968.

WEINERT, N. C.; VOLPATO, J.; COSTAS, A.; ANTUNES, R. R.; OLIVEIRA, A. C.; MATTOSO, C. R. S.; SAITO, M. E. Hematology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) subjected to anesthesia and anticoagulation protocols. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 4237-4250, 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4237.

WU, Y. X.; YU, C. H.; DONG, X. Y.; JIANG, X. X.; LIU, G.; NIE, S. P.; DAI, Q. Q.; KWON, T. H.; ZHOU, X. Characterization, enzymatic and biological properties of a dominant lactic acid bacteria strain of *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* isolated from

stinky mandarin fish. **Food Science and Technology**. Campinas, v. 43, e91722, 2023. ISSN 1678-457X (Online). DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.91722>.

XU, Z.; PARRA, D.; GÓMEZ, D.; SALINAS, I.; ZHANG, Y. A.; VON GERSDORFF JØRGENSEN L., HEINECKE, R. D.; BUCHMANN, K.; LAPATRA, S.; SUNYER, J. O. Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, p. 110:13097–13102, 2013. DOI: [10.1073/pnas.1304319110](https://doi.org/10.1073/pnas.1304319110).

XUE, J.; SHEN, K.; HU, Y.; HU, Y.; KUMAR, V.; YANG, G.; WEN, C. Effects of dietary *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Paracoccus marcusii*, and *Lactobacillus plantarum* supplementation on the growth, immune response, antioxidant capacity, and intestinal health of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Reviews in Aquaculture**, 2020.

YAMASHITA, M. M.; PEREIRA, S. A.; CARDOSO, L.; ARAUJO, A. P.; ODA, C. E.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; MARTINS, M. L.; MOURIÑO, J.L. Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. **Aquaculture Nutrition**, v. 3, n. 7, p. 1235-1243, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12498>.

YANG, G.; CUI, X.; LIU, S.; LU, J.; HOU, X.; MENG, W.; ZHU, R.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHENG, W.; FANG, W. Effects of dietary *Lactobacillus helveticus* on the growth rate, disease resistance and intestinal health of pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Aquaculture**, v. 544, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737038>.

YANG, G.; CUI, X.; LIU, S.; LU, J.; HOU, X.; MENG, W.; ZHU, R.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHENG, W.; FANG, W. Effects of dietary *Lactobacillus helveticus* on the growth rate, disease resistance and intestinal health of pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). **Aquaculture**, v. 544, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737038>.

ZHANG, Y.; LIANG, X-F.; HE, S.; FENG, H.; LI, L. Dietary supplementation of exogenous probiotics affects growth performance and gut health by regulating gut microbiota in Chinese Perch (*Siniperca chuatsi*). **Reviews in Aquaculture**, 2022.

ZHANG, Y.; QI, X.; ZHANG, Z.; JIN, Z.; WANG, G.; LING, F. Effects of dietary *Cetobacterium somerae* on the intestinal health, immune parameters and resistance against *Nocardia seriolae* of largemouth bass, *Micropterus salmoides*, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 135, 2023. ISSN 1050-4648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108693>.

ZHU, L.Y.; PAN, P.P.; FANG, W.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X. Essential Role of IL-4 and IL-4R α Interaction in Adaptive Immunity of Zebrafish: Insight into the Origin of Th2-like Regulatory Mechanism in Ancient Vertebrates. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5571-5584, 2012.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; DELSHAD, S.T.; ADEL, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K.; LAZADO, C. C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 228–241, 2016.