

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

**Toxicidade, eficácia e efeitos morfofuncionais do antimicrobiano  
azitromicina para a tilápia *Oreochromis niloticus***

NATÁLIA SAYURI SHIOGIRI

**São Carlos - SP**  
**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS**

**Toxicidade, eficácia e efeitos morfofuncionais do antimicrobiano  
azitromicina para a tilápia *Oreochromis niloticus***

Aluna: Natália Sayuri Shiogiri

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências, Área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.

Orientação: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

Co-orientação: Prof. Dr. Claudinei da Cruz

**São Carlos – SP**  
**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S556t Shiogiri, Natália Sayuri  
Toxicidade, eficácia e efeitos morfofuncionais do  
antimicrobiano azitromicina para a tilápia  
Oreochromis niloticus / Natália Sayuri Shiogiri. --  
São Carlos : UFSCar, 2016.  
87 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2015.

1. Hematologia. 2. Morfologia. 3. Estresse  
oxidativo. 4. Imunidade inata. 5. Peixe. I. Título.

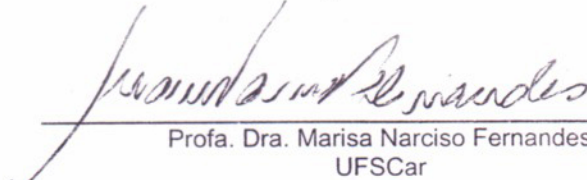


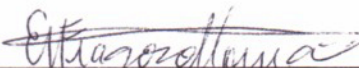
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Natália Sayuri Shiogiri, realizada em 24/08/2015:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Evelise Nunes Fragoso de Moura  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ulisses de Padua Pereira.  
UEL

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira  
UNESP

*Aos meus pais e à minha irmã,*

*Pelo apoio, incentivo aos estudos, estímulo e carinho.*

*Ao meu namorado,*

*Pela paciência, conselhos e grande apoio, incentivo e suporte durante todo o processo.*

## Agradecimentos

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela orientação, ajuda, ensinamentos, incentivos, paciência e compreensão por todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Claudinei da Cruz, pela co-orientação, ajuda, amizade, ensinamentos, paciência e companheirismo que já duram 10 anos, muito obrigada por estar presente em mais essa etapa.

Aos membros da banca examinadora que gentilmente se dispuseram a analisar este trabalho e pela contribuição para a sua melhoria.

Aos meus pais, Helio e Cida, pelo apoio, incentivo e educação e à minha irmã Priscila pela amizade e amor incondicional.

Ao meu eterno namorado, Nilton, por ter me ajudado a não desistir e apoiado em cada etapa deste difícil processo de formação científica.

Aos amigos do laboratório LZBC, em especial a Driele pela ajuda nas análises de estresse oxidativo, e todos àqueles que me ajudaram nas extensas coletas em Jaboticabal.

Aos amigos do NEPEAM, em especial a Cynthia, a Patrícia e o Roberto pela parceria nos longos dias de trabalho e ajuda desde a idealização até a realização dos experimentos, e todos que me ajudaram nas coletas e também contribuíram na realização dos experimentos, aguentando o sol forte do verão Jaboticabalense.

À Thaís e Silvia do LAPOA-CAUNESP e Fábio Zanuzzo pela ajuda nas análises de imunologia e também pela amizade.

Ao CEPAV-Tecnologia em Saúde Animal, no nome do Sr. Mauro, pelo fornecimento do antimicrobiano deste estudo e suporte nos experimentos.

À Vivian, Priscila Rossi, Francine, Fernanda, Jaqueline Pérola, Aruana, Camila Cv, Gabriela e Iara pelo companheirismo, amizade, apoio e conselhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (Processo número 2011/21552-6), indispensável para a realização deste trabalho.

**Muito obrigada!**

*“Feliz aqueles cujo conhecimento*

*é livre de ilusões e superstições.”*

**Buda**

*“O conflito não é entre o bem e o mal,*

*mas entre o conhecimento e a ignorância.”*

**Buda**

## Resumo

O aumento da produção de peixes em sistema intensivo implica no uso de antimicrobianos em tratamento de doenças causadas por bactérias. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar toxicidade aguda (CL50;48h) do antimicrobiano azitromicina (AZT) para alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Os seus efeitos em jovens de tilápia, após exposição crônica (14 dias), pela análise hematológica, morfologia de brânquias, fígado e rins e respostas do sistema antioxidante no fígado, assim como a determinação da eficácia sobre *Aeromonas hydrophila*, pela análise hematológica e resposta imune inata, além dos efeitos morfológicos em brânquias, fígado e rins e respostas do sistema antioxidante no fígado. A toxicidade aguda (CL50;48h) da AZT para tilápia foi  $> 100 \text{ mg L}^{-1}$  sendo classificada como praticamente não tóxica. Após exposição crônica, ocorreu aumento do hematócrito (Hct), concentração de hemoglobina (Hb), e no volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM) sem alterações nas demais variáveis da série vermelha. Os leucócitos aumentaram após exposição a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de AZT. As alterações histológicas nas brânquias sugerem resposta de defesa contra agente irritante e indicou estrutura e função normal do órgão; nos rins não ocorreu alterações e no fígado foram classificadas como moderadas a severas. No ensaio de eficácia, com ração medicada com AZT ( $100$  e  $125 \text{ mg kg}^{-1}$ ) aos animais infectados com *A. hydrophila* se mostrou eficiente, e todos os animais tratados sobreviveram. A mortalidade no grupo não tratado foi de 22 %. O hematócrito diminuiu e os índices hematimétricos, hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular média aumentaram. A porcentagem de linfócitos diminuiu e a de neutrófilos aumentou nos animais infectados não-tratados, mas sem alteração nos animais tratados. Não ocorreu alteração na imunidade inata, avaliada pela atividade da lisozima, sistema complemento e “burst” respiratório dos leucócitos. As brânquias não apresentaram alterações que interferissem na função do órgão. No fígado as alterações foram classificadas de leves a moderadas, sem alteração nos rins. Animais tratados com AZT não apresentaram efeitos adversos relacionados às células de defesa e atividade imune inata. O fármaco também não causou alterações nas enzimas de defesa antioxidantes no fígado dos animais após exposição crônica, sem estresse oxidativo. Após desafio com *A. hydrophila* ocorreu aumento da atividade da catalase, glutatona peroxidase, glutatona transferase e nível de glutatona no fígado dos animais tratados com AZT e o nível de glutatona diminuiu no grupo infectado e não tratado. Estas respostas sugerem que a infecção causada pela *A. hydrophila* pode induzir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, estimulou as respostas das defesas antioxidantes. Essas respostas foram eficientes para evitar a ocorrência de estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** hematologia, morfologia, imunidade inata, estresse oxidativo, “burst” respiratório, peixe.



## Abstract

The increase of fish production in intensive systems involves the use of antimicrobials in the treatment of diseases caused by bacteria. Therefore, the aim of this study was to evaluate acute toxicity (CL50; 48h) of the antimicrobial azithromycin (AZT) for fingerlings of tilapia (*Oreochromis niloticus*), the effects on young tilapia, after chronic exposure (14 days) via hematological analysis, morphology gills, liver and kidneys and antioxidant system responses in the liver, and to determine the efficacy of control of *Aeromonas hydrophila* via hematological analysis and innate immune response, in addition to the morphological effects gills, kidneys and liver and antioxidant system responses in the liver. The acute toxicity (LC50; 48h) of the AZT to tilapia was  $> 100 \text{ mg L}^{-1}$  being the AZT classified as practically non-toxic. After chronic exposure, there was an increase in hematocrit (Hct), hemoglobin concentration (Hb) and in the mean corpuscular volume of erythrocytes (MCV) and no change in the other variables of the red series was observed. The leukocytes increased after exposure to  $100 \text{ mg L}^{-1}$  AZT. Histological changes in gills suggest defense response against irritant agent and indicate normal structure and function of the organ; in the kidney no changes were observed and in the liver changes were classified as moderate to severe. In the efficacy trial, the offering of medicated food with AZT ( $100$  and  $125 \text{ mg kg}^{-1}$ ) to animals infected with *A. hydrophila* was efficient and all of the treated animals survived; of the untreated animals 22% came to death. The Hct decreased and the hematimetric indices mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration increased, the percentage of lymphocytes decreased and the percentage of neutrophil increased in untreated infected animals, but were unchanged in animals treated with AZT. No change occurred in innate immunity assessed by the activity of lysozyme, complement system and leukocytes respiratory burst activity. Gills showed no changes that could interfere in the organ function, in the liver changes were classified from mild to moderate and didn't occurred alterations in the kidneys. Animals treated with AZT showed no adverse effects related to defense cells and the innate immune activity. The drug also caused no changes in antioxidant defense enzymes in the animals' liver after chronic exposure and did not generate oxidative stress. After challenge with *A. hydrophila* occurred an increase in the activity of catalase, glutathione peroxidase, glutathione transferase and glutathione level in the liver of animals treated with AZT and the glutathione level decreased in the infected group and untreated. These responses suggest that infection caused by *A. hydrophila* can induce an increased production of ROS and, consequently, stimulated responses of the antioxidant defenses. These responses were effective to prevent the occurrence of oxidative stress.

**Keywords:** hematology, morphology, innate immunity, oxidative stress, respiratory burst, teleost.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Ação de xenobióticos em peixes e mecanismos de defesa.....	3
1.2. Uso de antimicrobianos do grupo macrolídeos na aquicultura.....	8
1.3. Justificativa.....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1. Ensaio de sensibilidade e toxicidade aguda.....	13
3.2. Ensaio de toxicidade crônica.....	15
3.3. Indução de infecção experimental por <i>Aeromonas hydrophila</i> e eficácia.....	16
3.3.1. Obtenção do inóculo de <i>Aeromonas</i> .....	17
3.3.2. Confirmação da infecção de tilápias por <i>Aeromonas</i> .....	18
3.3.3. Preparação da ração medicada com AZT.....	19
3.4. Coleta de amostras para análise bioquímica e histológica.....	19
3.5. Variáveis hematológicas e osmolalidade plasmática.....	20
3.6. Resposta imune inata.....	21
3.6.1. Concentração de Lisozima.....	21
3.6.2. Atividade hemolítica do Sistema Complemento.....	21
3.6.3. Atividade respiratória dos leucócitos.....	22
3.7. Biomarcadores de estresse oxidativo.....	22
3.7.1. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	23
3.7.2. Atividade da Catalase (CAT).....	23
3.7.3. Atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	24
3.7.4. Atividade da glutathiona-S-transferase (GST).....	24
3.7.5. Determinação da Glutathiona (GSH).....	25
3.7.6. Determinação de proteína carbonilada.....	25
3.7.7. Determinação de peróxidos de lipídeos (LPO).....	26
3.8. Análises morfofuncionais.....	26
3.9. Análise estatística.....	31
<b>4. Resultados</b> .....	32
4.1. Toxicidade aguda.....	32
4.2. Toxicidade crônica.....	32
4.2.1. Variáveis hematológicas.....	34
4.2.2. Histologia das brânquias.....	37
4.2.3. Histologia e histoquímica do fígado.....	40
4.2.4. Histologia do rim.....	44
4.2.5. Defesas antioxidantes no fígado.....	45
4.2.6. Danos hepáticos.....	46

4.3. Eficácia da azitromicina em <i>O. niloticus</i> desafiada com <i>A. hydrophila</i> ...	47
4.3.1. Variáveis hematológicas.....	48
4.3.2. Imunidade Inata.....	51
4.3.3. Histologia das brânquias.....	52
4.3.4. Histologia e histoquímica do fígado.....	54
4.3.5. Histologia do rim.....	58
4.3.6. Defesas antioxidantes no fígado.....	59
4.3.7. Danos hepáticos.....	60
<b>5. Discussão.....</b>	<b>61</b>
5.1. Toxicidade da Azitromicina.....	61
5.2. Variáveis Hematológicas.....	63
5.3. Alterações Morfológicas.....	68
5.3.1. Brânquias.....	68
5.3.2. Fígado.....	70
5.3.3. Rins.....	72
5.4. Respostas antioxidantes e estresse oxidativo no fígado.....	73
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>76</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Eritromicina, Azitromicina.....	10
<b>FIGURA 2.</b> Procedimento experimental do ensaio de toxicidade aguda da azitromicina para a tilápia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	15
<b>FIGURA 3.</b> Valores médios ( $\pm$ DP) das variáveis hematológicas de <i>Oreochromis niloticus</i> após exposição a azitromicina em ensaio crônico (14 d).....	35
<b>FIGURA 4.</b> Células sanguíneas de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	36
<b>FIGURA 5.</b> Fotomicrografias representativas de brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à azitromicina em ensaio de toxicidade crônica (14 d).....	39
<b>FIGURA 6.</b> Fotomicrografias representativas de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à azitromicina em ensaio de toxicidade crônica (14 d).....	42
<b>FIGURA 7.</b> Fotomicrografia de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à azitromicina submetidos a teste de toxicidade crônica indicando colorações diferentes em resposta à reação de PAS.....	43
<b>FIGURA 8.</b> Fotomicrografias representativas de rim de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à azitromicina em ensaio de toxicidade crônica (14 d).....	45
<b>FIGURA 9.</b> Valores médios ( $\pm$ DP) da atividade específica das enzimas (Superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutathiona peroxidase - GSH, glutathiona-S-transferase - GST) e nível de glutathiona (GSH) hepática de <i>Oreochromis niloticus</i> do grupo controles e grupos expostos à azitromicina em ensaio crônico (14 d).....	46
<b>FIGURA 10.</b> Valores médios ( $\pm$ DP) da concentração de proteínas carboniladas e de hidróperóxido de cumeno no fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> submetido à azitromicina após ensaio de toxicidade crônica (14 d)....	47
<b>FIGURA 11.</b> Valores médios ( $\pm$ DP) das variáveis hematológicas de <i>Oreochromis niloticus</i> após exposição a azitromicina em ensaio de eficácia (5 d).....	49
<b>FIGURA 12.</b> Lisozima, sistema complemento no soro e atividade ( <i>burst</i> ) respiratória dos leucócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> submetido à azitromicina em ensaio de eficácia (5 dias).....	51
<b>FIGURA 13.</b> Fotomicrografias representativas de brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> submetidos ao ensaio de eficácia (5 d).....	52
<b>FIGURA 14.</b> Fotomicrografias representativas de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> submetidos ao ensaio de eficácia (5 d).....	55
<b>FIGURA 15.</b> Fotomicrografia de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> expostos à azitromicina submetidos ao ensaio de eficácia indicando colorações diferentes em resposta à reação de PAS.....	56
<b>FIGURA 16.</b> Fotomicrografias representativas de rim de <i>Oreochromis niloticus</i> submetidos ao ensaio de eficácia (5 d).....	58

- FIGURA 17.** Valores médios ( $\pm$  DP) da atividade específica das enzimas (Superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutathione peroxidase - GSH, glutathione-S-transferase - GST) e nível de glutathione (GSH) hepática de *Oreochromis niloticus* em ensaio de eficácia (5 d)..... 60
- FIGURA 18.** Valores médios ( $\pm$  SD) da concentração de proteínas carboniladas e de hidroperóxido de cumeno no fígado de *Oreochromis niloticus* submetido à azitromicina após ensaio de eficácia (5 d)..... 61

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Alterações histopatológicas em brânquias e respectivos estágios que tem por base o grau de possibilidade de restauração das lesões.....	29
<b>TABELA 2.</b> Alterações histopatológicas em fígado e respectivos estágios que tem por base o grau de possibilidade de restauração das lesões.....	30
<b>TABELA 3.</b> Alterações histopatológicas em rim e respectivos estágios que tem por base o grau de possibilidade de restauração das lesões.....	31
<b>TABELA 4.</b> Valores médios ( $\pm$ DP) das características físicas e químicas da água durante o ensaio de toxicidade aguda.....	32
<b>TABELA 5.</b> Valores médios ( $\pm$ DP) das características físicas e químicas da água durante o ensaio de toxicidade crônica.....	33
<b>TABELA 6.</b> Valores médios ( $\pm$ DP) de leucócitos e trombócitos ( $n 10^3$ ) e porcentagem diferencial de leucócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> em ensaio crônico (14 dias).....	36
<b>TABELA 7.</b> Médias ( $\pm$ DP) de osmolalidade plasmática de <i>Oreochromis niloticus</i> submetido à azitromicina em ensaio crônico.....	37
<b>TABELA 8.</b> Características histológicas das brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após exposição crônica (14 dias) a azitromicina (AZT).....	38
<b>TABELA 9.</b> Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após ensaio crônico (14 dias).....	40
<b>TABELA 10.</b> Histologia do fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> em ensaio crônico (14 dias).....	41
<b>TABELA 11.</b> Índice de alterações histopatológicas (IAH) de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após ensaio crônico (14 dias).....	43
<b>TABELA 12.</b> Valores da contagem de colônias de <i>Aeromonas</i> sp. isoladas de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após ensaio de eficácia (5 d).....	47
<b>TABELA 13.</b> Valores médios ( $\pm$ DP) de leucócitos e trombócitos ( $n 10^3$ ) e porcentagem diferencial de leucócitos de <i>Oreochromis niloticus</i> em ensaio de eficácia (5 d).....	50
<b>TABELA 14.</b> Médias ( $\pm$ DP) da osmolalidade plasmática de <i>Oreochromis niloticus</i> submetido à azitromicina em ensaio de eficácia (5d).....	51
<b>TABELA 15.</b> Características histológicas das brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após ensaio de eficácia (5 d).....	53
<b>TABELA 16.</b> Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias de <i>Oreochromis niloticus</i> após ensaio de eficácia (5 d).....	54
<b>TABELA 17.</b> Características histológicas de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após ensaio de eficácia (5 d).....	57
<b>TABELA 18.</b> Índice de alterações histopatológicas (IAH) de fígado de <i>Oreochromis niloticus</i> após ensaio de eficácia (5 d).....	58
<b>TABELA 19.</b> Toxicidade aguda de antibióticos em diferentes espécies de peixes.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

A pesca e aquicultura supriram o mundo com aproximadamente 148 milhões de toneladas de peixes em 2010, com um mercado total de US\$ 217,5 bi (FAO, 2010). Mais recentemente, a produção aquícola mundial alcançou outro recorde histórico de 90,4 milhões de toneladas (peso equivalente vivo) em 2012 (US\$ 144,4 bilhões), incluindo 66,6 milhões de toneladas de peixes destinados à alimentação (US\$ 137,7 bilhões) e 23,8 milhões de toneladas de alga aquática (maioria algas marinhas, US\$ 6,4 bilhões) e, ainda ocorreu a produção de 22.400 toneladas de produtos não alimentícios (US\$222,4 milhões), tais como pérolas e conchas para uso ornamental e decorativo (FAO, 2014).

Neste cenário de aumento de produção de peixes, a tilapicultura tem se destacado em relação aos demais organismos (EL-SAYED, 1999). A tilápia, (*Oreochromus niloticus*), destaca-se devido a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (HAYASHI, 1995); possui hábito alimentar onívoro, e aceita rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase de terminação (BOSCOLO et al., 2001).

A produção mundial de tilápias e outros ciclídeos, em 2010, foram de aproximadamente 3,5 milhões de toneladas (FAO, 2012). Esta espécie é a mais produzida no Brasil, podendo ser cultivada em todo o território nacional, exceto nas regiões abrangidas pelas Bacias do Amazonas e Paraguai, onde seu cultivo não é permitido pela legislação ambiental vigente. Em 2013, a produção de tilápia foi de 169.306 toneladas, correspondendo à 43,1 % do total de peixe produzido (IBGE, 2013).

A intensificação da produção tem alguns fatores limitantes, dentre os quais, a ocorrência de doenças infecciosas (KIBENGE et al., 2012). Entretanto, em contraste aos animais de produção intensiva terrestres, as linhagens usadas na aquicultura são

derivadas recentemente de linhagens silvestres (DUARTE et al., 2007) e pode não ter tido tempo suficiente para desenvolver mecanismos eficientes de adaptação ao confinamento de alta densidade (RODRIGUEZ-RAMILO et al., 2011).

O estresse crônico gerado pelo adensamento de organismos favorece a emergência de doenças causadas por patógenos que, em geral, são inofensivos em condições naturais, mas oportunistas quando há uma redução da imunidade animal. A ocorrência de doenças bacterianas tem sido um fator limitante para o desenvolvimento da aquicultura brasileira e mundial. Os agentes causadores de doenças infecciosas mais comuns na aquicultura são as bacterioses (54,9%) seguidas de viroses (22,6%), parasitoses (19,4%) e doenças fúngicas (3,1%) (KIBENGE et al., 2012).

As bactérias são parte da microbiota natural do meio aquático e, algumas espécies, são patogênicas oportunas (KIRKAN et al., 2003) causando grandes perdas em criações intensivas que pode atingir até 100% de mortalidade (COSTA et al., 2008). Na criação de tilápias, as bactérias mais isoladas em surtos com alta mortalidade foram as *Aeromonas* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Francisella* sp, *Vibrio anguillarum*, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* sp. (MORAES e MARTINS, 2004; BIRCKBECK et al., 2011).

As bactérias do gênero *Aeromonas*, estão entre as mais comuns em habitats de água doce em todo mundo, e essa distribuição ocorre devido a sua fácil adaptabilidade a diferentes ambientes aquáticos (CIPRIANO, 2001, CARRASCHI, 2012). As *Aeromonas* são bactérias em forma de bastonete com um flagelo polar, gram-negativas, anaeróbicas facultativas e não esporulantes (ROBERTS, 1993). São consideradas como citocromo oxidase positivas, com capacidade de fermentar glicose com ou sem produção de gás, sendo insensível ao agente vibriostático O/129 (2,4-diamino,6,7-diisopropyl pteridine) (CIPRIANO, 2001). Dentre as diferentes espécies, a *A. salmonicida*



e a *A. hydrophila* são responsáveis por doenças severas em espécies de peixes criados comercialmente (NEWMAN, 1993). *A. hydrophila* alcança os diferentes órgãos, via corrente sanguínea, coloniza principalmente o fígado e rins, causando infecções agudas e crônicas com diversas alterações patológicas que incluem deterioração da cauda, das nadadeiras, incluindo septicemia hemorrágica devido à lise de eritrócitos, acompanhado de ulcerações (SHÄPERCLAUS et al., 1992).

Para o controle de bacterioses são empregados vários grupos de antimicrobianos, tais como a tetraciclina, sulfonamidas e cloranfenicol (DEFOIRDT et al., 2007, BURRIDGE et al., 2010, ROMERO et al., 2012) dos quais apenas o florfenicol e a oxitetraciclina estão registrados (9319/2007 e 9002/2004, respectivamente) para uso aquícola no Brasil (SINDAN, 2015). Atualmente, antimicrobianos pertencentes ao grupo dos macrolídeos tem despertado o interesse para uso em aquicultura.

### **1.1. Ação de xenobióticos em peixes e mecanismos de defesa**

Os xenobióticos, como os agentes terapêuticos ou profiláticos, são liberados diretamente da água e absorvidos via brânquias, pele ou via intestino, pela alimentação. O sangue é o meio condutor de xenobióticos até os demais tecidos e órgãos, tendo importância fundamental em estudos de toxicologia, uma vez que, toda substância absorvida é transportada pela corrente sanguínea a outros tecidos e órgãos onde serão metabolizados, conduzidos à excreção. As células sanguíneas são as primeiras células a sofrerem os efeitos tóxicos de um xenobiótico, respondendo a alterações em tecidos e órgãos em decorrência da sua ação, além de ser um modelo útil para investigar as alterações nas células de defesa, como leucócitos, e sistema imune inato. Além do sangue, os órgãos que são as vias de entrada no organismo e/ou locais de metabolismo e

excreção, também podem ser alterados de forma a comprometer a sua função durante esses processos.

Assim, as alterações nas células sanguíneas e plasma indicam a condição fisiológica do peixe quando em determinada situação ambiental (BANERJIE e HOMECHAUDHURI, 1990). Além disto, estas alterações constituem sinais de danos à saúde dos peixes.

Os eritrócitos de peixes são nucleados e contém organelas; seus ribossomos sintetizam proteínas, sendo suas mitocôndrias funcionais durante todo o ciclo celular (NAGASAKA et al., 2004).

Os leucócitos são células de defesa e a contagem diferencial de leucócitos permite detectar a porcentagem dos diferentes tipos de células presentes no sangue de um animal, cuja alteração pode indicar ajustes a uma dada condição ambiental e/ou presença de doenças infecciosas (RANZANI-PAIVA, 1995, TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Os peixes possuem vários tipos de leucócitos que estão envolvidos em defesas celulares específicas e não específicas, como os linfócitos, monócitos, granulócitos, além de células citotóxicas não específicas (SECOMBES, 1996). Os linfócitos são células de defesa que atuam principalmente nas infecções do sistema imune inato e adquirido. Os macrófagos são células mononucleadas, altamente fagocíticas, que têm a capacidade de secretar espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio e eliminar uma grande variedade de patógenos (bactérias, larvas de helmintos) (SECOMBES, 1996). Os granulócitos são altamente móveis e tendem a predominar durante os primeiros dias após a infecção; são divididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos, sendo este último, ausente na maioria das espécies de peixes. Os granulócitos, principalmente os neutrófilos, são fagocíticos e produzem ERO, porém,

sua atividade bactericida é relativamente escassa, quando comparada aos macrófagos (SECOMBES, 1996).

Os peixes possuem muitos mecanismos não-específicos e específicos humorais, as quais são mediados por células para resistir às infecções (ELLIS, 1999). As imunoglobulinas produzidas por linfócitos apresentam importante papel no sistema imune, neutralizando bactérias ou tornando-as mais susceptíveis à fagocitose (INGRAM, 1980). O mecanismo de defesa inata dos peixes contra bactérias inclui a produção de substâncias anti-microbianas de amplo espectro e proteínas de fase aguda, ativação não clássica do complemento, liberação de citocinas, inflamação e fagocitose (ELLIS, 2001).

Um fator humoral não específico é a lisozima, uma enzima que hidrolisa o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina que são constituintes da camada de peptidoglicanos das paredes celulares bacterianas. Esta enzima foi encontrada no muco, soro e tecidos ricos em leucócitos (ELLIS, 1999). Em ovos de salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*), apresenta ação bactericida para *A. hydrophila*, *A. salmonicida* e *Carnobacterium piscicola* na concentração de  $700 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que é aproximadamente 30 % da concentração presente no vitelo da maioria dos ovos de salmonídeos (YOUSIF et al., 1994 *apud* ELLIS, 1999).

O complemento é um sistema de proteínas do soro que é essencial para muitos mecanismos de defesa (ELLIS, 1999). Os peixes teleósteos possuem a via alternativa e a via clássica de ativação do sistema complemento, diretamente comparáveis aos de mamíferos (YANO, 1996). A atividade da via alternativa, a qual é anticorpo independente, é muito alta em soro de peixe quando comparada ao soro de mamíferos (YANO, 1996), sugerindo que essa via seja mais importante em peixes do que em mamíferos (ELLIS, 1999, ZANUZZO, 2015).

As células fagocíticas têm um importante papel nas defesas antibacterianas. Resumidamente, essas células podem engolfar a bactéria e matá-la pela produção de ERO durante um processo chamado de explosão respiratória (*burst* respiratório), havendosse processo, inclusão de produtos que têm atividade bactericida potente que são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$  e o radical livre hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (SECOMBES, 1996).

A biotransformação de xenobióticos consiste na transformação de um composto lipofílico mais polar em hidrofílico de forma a ser mais facilmente excretado do que o composto original (VERMEULEN, 1996). Este processo reduz a afinidade do xenobiótico por proteínas do plasma e dos tecidos, pois compostos hidrofílicos tendem a ser menos permeáveis nas membranas biológicas, por isso, mais facilmente eliminados (HEATH, 1995). A consequência desse processo é a diminuição do tempo de permanência do xenobiótico no organismo e, conseqüentemente, diminuição de sua toxicidade (LIVINGSTONE, 1998).

As enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos, assim como seus metabólitos, são as enzimas de biotransformação de fase 1, como a família P450, e de fase 2, como a Glutathione-S-Transferase (GST), além de compostos como a glutathione. O processo de detoxificação pode gerar ERO que são sequestradas e/ou transformadas pelas enzimas e compostos antioxidantes. A perturbação do balanço pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes, é denominada de estresse oxidativo. Esta situação pode aumentar a produção de peroxidação lipídica em tecidos e causar danos celulares (SOUTHORN e POWIS, 1988), tendo sido proposto como indicadores de estresse oxidativo mediados por poluentes ou outros xenobióticos (AHMAD et al., 2000, VAN DER OOST et al., 2003).

A geração de ERO é inevitável na vida aeróbia (DiGIULIO e MEYER, 2008), principalmente quando o processo de respiração aeróbia é incompleto, por razões fisiológicas e patológicas. Regularmente, as ERO atuam como moléculas de sinalização, porém, em altas concentrações, podem ocasionar estresse oxidativo (ANDERSEN, 2004). Em geral, todos os organismos possuem mecanismos para minimizar os impactos causados pelas ERO (DiGIULIO e MEYER, 2008); esses mecanismos incluem um sistema de enzimas que agem removendo as ERO, estas, por sua vez, são as chamadas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), além da glutatona (GSH) que é um peptídeo, entre outras moléculas; todas estão presentes nos tecidos de peixes e são abundantes, particularmente no fígado (LACKNER, 1998).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra o radical superóxido ( $O_2^-$ ) (LEITCH et al., 2009); sua atividade consiste na dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O$  e  $H_2O_2$ :  $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . A catalase se localiza nos peroxissomos e é responsável pela degradação do  $H_2O_2$  à  $H_2O$  e  $O_2$  ( $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ ) (SCANDALIOS, 2005). A glutatona peroxidase provê outro mecanismo pelos quais os animais podem detoxificar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (ARTHUR, 2000), utilizando a glutatona reduzida (GSH) como doadora de elétrons para o processo:  $GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$  ou  $GSH + ROOH \rightarrow GSSG + H_2O + ROH$ . Essa enzima é uma alternativa eficiente para manter níveis baixos de  $H_2O_2$ , uma vez que pouca quantidade de CAT é encontrada no citosol (CORTELLA, 2010).

A glutatona-S-transferase catalisa o ataque nucleofílico da GSH em compostos não polares que contêm um carbono eletrofílico, nitrogênio ou átomo de enxofre (HAYES, 2005). A glutatona é um tripeptídeo  $\gamma$ -glutamil-cistetil-glicina, e é

sintetizada por duas reações, a primeira catalisada pela glutamato cisteína ligase e a segunda por GSH sintetase e é o substrato para a GPx e GST.

As enzimas e proteínas estruturais podem ser atacadas pelas ERO gerados durante o processo de biotransformação e, como consequência, pode ocorrer modificação oxidativa desses compostos numa variedade de processos fisiológicos e patológicos. Os danos teciduais promovidos pelas ERO podem ser considerados proporcionais aos níveis de lipoperoxidação tecidual (WILHELM FILHO, 1996), sendo que, diversos estudos já evidenciaram o aumento do nível de lipoperoxidação em vários tecidos de peixes expostos a uma variedade de contaminantes e/ou xenobióticos (VAN DER OOST et al., 2003).

As proteínas podem ser modificadas por uma grande quantidade de reações envolvendo espécies reativas de oxigênio. Entre essas reações, a carbonilação tem atraído atenção, pois as modificações ocasionadas nas cadeias de aminoácidos das proteínas apresentam uma natureza irreversível e irreparável, alterando, assim, a estrutura da proteína ou sua função (NYSTROM, 2005; McDONAGH et al., 2006, DORTS et al., 2009). Cadeias de aminoácidos podem modificar-se irreversivelmente, em grupos aldeídos ou cetonas (carbonilação) a qual pode conduzir à agregação, inativação ou degradação de proteínas (LEVINE et al., 1994).

## **1.2. Uso de antimicrobianos do grupo macrolídeos na aquicultura**

Os antimicrobianos do grupo dos macrolídeos contém um anel de lactona de vários membros ao qual se ligam um ou mais desoxi-glicóis. Durante mais de 40 anos, o único representante dos macrolídeos de uso clínico geral foi a eritromicina (ERT) (Fig. 1A) e, atualmente, pelo menos 8 representantes (azitromicina, eritromicina, claritromicina, diritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina e

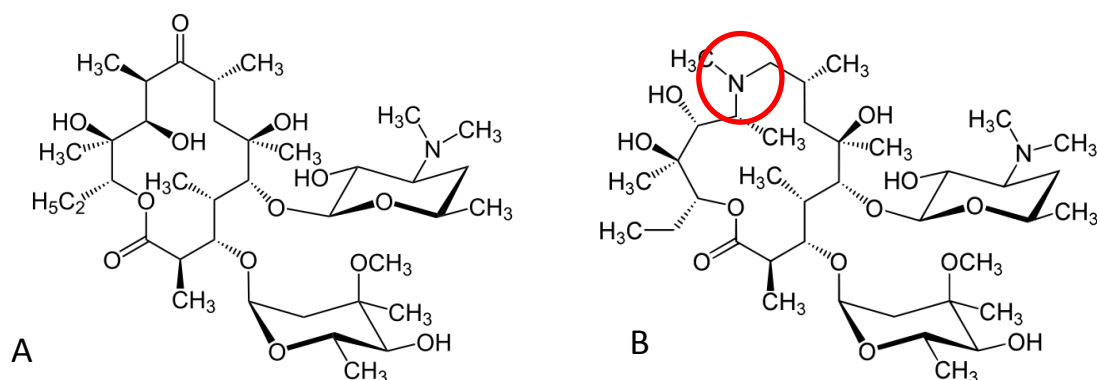
espectinomomicina) estão disponíveis no mercado. Esses antimicrobianos são agentes de amplo espectro de ação e são empregados no tratamento de doenças infecciosas tanto em humanos como em diferentes animais (BAHAL e NAHATA, 1992).

A eritromicina é constituída por lactona com 14 membros e não contém um átomo de nitrogênio. A azitromicina (AZT, 9-deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerythromycin) (Fig. 1B) é semelhante estruturalmente semelhante à ERT e é constituída por lactona que tem 15 membros e contém um átomo de nitrogênio, constituindo uma nova classe de antimicrobiano, os azalídeos (BRIGHT et al., 1988). Os nitrogênios azalídeos resultam em um comportamento químico dibásico, o que diferencia a AZT de praticamente todos os outros macrolídeos, os quais possuem uma natureza monobásica (SHIKAI e OHTA, 1996).

Estas diferenças são responsáveis por melhores características farmacológicas e microbiológicas da AZT, tais como aumento das propriedades anfipática, espectro de ação mais amplo frente aos microorganismos Gram-positivos, maior atividade contra bactérias Gram-negativas, difusão tecidual mais rápida e mais elevada, com meia-vida tecidual mais prolongada (68 h) do que a da ERT (1,5 h) e outros macrolídeos (até 40 h); a AZT é ainda mais estável em meio ácido do que a ERT (GLADUE et al., 1989; LODE, 1991; PETERS e CLISSOLD, 1992; PETERS et al., 1992; JARURATANASIRIKUL et al., 1996).

Os estudos com a ERT em peixes relatam que sua toxicidade aumenta com o tempo e não com a concentração (MIGLIORE et al., 1997). Entretanto, são raros os estudos utilizando o antimicrobiano ERT, não havendo estudos com a AZT. Assim, a avaliação da toxicidade aguda e crônica é importante para se determinar os efeitos letais nos organismos expostos a altas concentrações de xenobióticos em curto período de

tempo e os efeitos subletais de concentrações baixas em um longo período de exposição (OMOREGIE et al., 1994).



**Figura 1.** A. Eritromicina, B. Azitromicina. Fonte: [es.wikipedia.org/wiki/Azitromicina](https://es.wikipedia.org/wiki/Azitromicina).

A AZT, como um possível antimicrobiano a ser utilizado na aquicultura, tem mecanismo de ação conhecido, com inibição da síntese proteica bacteriana, via ligação com a subunidade ribossomal 50S e impede a translocação dos peptídeos. Esse antimicrobiano tem boa penetração tecidual, incluindo tecidos fibroblásticos (GLADUE e SNIDER, 1990; CARLIER et al., 1991) e cerebral (ARAÚJO et al., 1991). Com aumento de biodisponibilidade celular, se acumulando no interior, possivelmente nos lisossomos de algumas células (CARLIER et al., 1991; SHEPARD et al., 1992), como nos macrófagos, nos quais pode atingir altas concentrações intracelulares (PETERS et al., 1992; FAIRGRIEVE et al., 2005; DEF, 2006) sem interferir na função fagocítica celular (BONNET e VAN der AUWERA, 1992). Em geral, intracelularmente está presente em forma microbiológica ativa (WILDFEUER et al., 1989), o que permite transferir o antibiótico das células fagocíticas para os locais de infecção como parte da resposta organismo à infecção. A eliminação do AZT é primariamente via hepática e somente pequena quantidade é excretado na urina. Aproximadamente 75% é eliminado de forma inalterada e não são conhecidos metabólitos ativos da AZT (ANVISA, 2014)



Estudos em salmão-rei (*Oncorhynchus tshawytscha*) demonstram que as altas concentrações teciduais e a prolongada retenção da AZT no organismo, aumentaram a eficácia do antimicrobiano contra *Renibacterium salmoninarum* quando comparada com a ERT (FAIRGRIEVE et al., 2005).

### 1.3. Justificativa

Devido à intensificação do processo de produção de peixes e à consequente utilização de farmacos de uso veterinários para o controle de doenças bacterianas, assim como de outras doenças durante todas as fases do ciclo de produção, faz-se necessário conhecer a toxicidade e a eficácia destes farmacos em peixes, uma vez que podem interferir em sistemas biológicos específicos.

A possível utilização da AZT em criação de tilápias para o tratamento de bacteriose causada por *A. hydrophila* gera as seguintes questões:

- 1) A utilização de AZT pode causar toxicidade aguda ou crônica em tilápia;
- 2) Durante a exposição prolongada, a AZT pode induzir alterações que comprometem a saúde destes organismos durante o ciclo produtivo;
- 3) A AZT é eficaz no tratamento de *A. hydrophila* e quais as alterações morfofuncionais induzidas nesse processo.

Assim, este estudo foi delineado para responder essas questões, ou seja, determinar a toxicidade aguda (CL50;48h) e crônica da AZT em tilápia (*O. niloticus*), além de avaliar a eficácia do antimicrobiano após infecção experimental com *A. hydrophila*. Para estas avaliações, foram selecionados alguns parâmetros para avaliação rápida da higidez animal (hematologia), imunidade inata, ocorrência de estresse oxidativo e alterações morfofuncionais em alguns órgãos relacionados a absorção, metabolismo e excreção de xenobióticos.

Estes estudos poderão servir como subsídios na tomada de decisão sobre a utilização, forma de administração, tempo e procedimento terapêutico durante o tratamento de doenças uma vez que a criação de tilápias é o setor dentro da aquicultura brasileira com maior porcentagem de desenvolvimento.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1. Estimar a toxicidade aguda (CL50;48h) do antimicrobiano azitromicina para alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*);
2. Avaliar as variáveis hematológicas, as respostas relacionadas à biotransformação, defesas antioxidantes no fígado, a morfologia das brânquias, fígado e rins após toxicidade crônica do antibiótico azitromicina em jovens de tilápia (*O. niloticus*);
3. Determinar a eficácia da azitromicina, administrado na ração, no controle da bacteriose causada pela *Aeromonas hydrophila* em jovens de tilápia (*O. niloticus*) após infecção experimental *in vivo*;
4. Analisar as variáveis hematológicas e sistema imune inato, as respostas relacionadas à biotransformação, defesas antioxidantes no fígado, a morfologia das brânquias, fígado e rins em jovens de tilápia (*O. niloticus*) após experimento de eficácia do antibiótico azitromicina em peixes infectados com *Aeromonas hydrophila*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes utilizados neste estudo foram provenientes do Centro de Aquicultura (CAUNESP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP. Os ensaios de toxicidade aguda e crônica e de eficácia foram conduzidos no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM/FCAV). As análises hematológicas, bioquímicas e morfológicas foram efetuadas no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, SP). As análises de imunidade inata foram efetuadas no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP. O antimicrobiano AZT foi fornecido pela Cepav Pharma Ltda.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade do Estado de São Paulo (FCAV/UNESP, São Paulo, Brasil, Protocolo no. 001191/12).

Os alevinos e jovens de tilápia (*O. niloticus*) foram mantidos (30 dias) em mesocosmos (400 L) com fluxo de água contínuo (oxigênio dissolvido  $> 4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; condutividade elétrica  $180 \pm 20 \mu\text{S cm}^{-1}$ ; pH =  $7,0 \pm 0,5$ ; dureza variando entre 48 a 58 mg de  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ). Os peixes foram alimentados até a saciedade, uma vez ao dia, com ração comercial (PoliNutri<sup>®</sup> com 32 % de proteína bruta).

#### 3.1. Ensaios de sensibilidade e toxicidade aguda

O controle de sensibilidade dos lotes de alevinos de tilápia (*O. niloticus*) (massa corpórea:  $3,0 \pm 1,0 \text{ g}$ ) foi realizado com a substância referência cloreto de potássio (KCl, *pro analysis*) (CL50; 48h) (ABNT, 2011). Os ensaios foram constituídos de um controle e cinco concentrações de KCl (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 g  $\text{L}^{-1}$ ), com três réplicas (n = 3 em cada réplica) e conduzidos em sistema estático, sem substituição da

água, em aquários de 3 litros. A concentração letal 50% (CL50; 48h) do KCl para a tilápia foi estimada em  $1,02 \text{ g L}^{-1}$  com intervalo de confiança de 95% entre  $0,76 \text{ g L}^{-1}$  e  $1,38 \text{ g L}^{-1}$ .

As características físicas e químicas da água foram semelhantes às de aclimatação.

A seguir, foram realizados ensaios preliminares para determinar o intervalo em que concentração de AZT causa zero e 100 % de mortalidade. Posteriormente, os ensaios definitivos foram realizados com alevinos de *O. niloticus* (peso corporal =  $3,0 \pm 1,0 \text{ g}$ ) com um controle (testemunha) e quatro concentrações crescentes de AZT (25, 50, 75 e  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), previamente diluído em 1 mL de etanol na proporção 1 mL etanol:1g AZT, com três réplicas ( $n = 3$  em cada réplica) sendo conduzidos em sistemas estáticos, sem substituição da água (Fig. 2). O período de exposição foi de 48 horas. A mortalidade foi avaliada diariamente.

As características físicas e químicas da água foram mantidas semelhante às da água de aclimatação e dos testes de sensibilidade. Os experimentos foram limitados ao teste limite de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de AZT conforme recomendado pela OECD (2009), pois nesta concentração é garantido que, com pelo menos 95 % de confiança, este organismo é sensível.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de regressão linear para determinar a relação concentração-mortalidade e os valores da CL50; 48h foram estimados pelo método Trimmed Sperm-Karber (HAMILTON et al., 1977).



**Figura 2.** Procedimento experimental do ensaio de toxicidade aguda da azitromicina para a tilápia (*Oreochromis niloticus*). **A e B)** Caixa de aclimatação dos animais em condição de bioensaio. **C)** Vista geral do experimento de toxicidade aguda na sala de bioensaio. **D)** e **E)** Detalhe do experimento de toxicidade aguda.

### 3.2. Ensaio de toxicidade crônica

Os ensaios de toxicidade crônica do AZT foram realizados utilizando exemplares jovens de *O. niloticus*, com peso médio de  $85,0 \pm 15,0$  g). Os ensaios foram conduzidos em mesocosmos (400 L), em sistema estático com aeração durante 14 dias.

A partir do resultado da toxicidade aguda ( $CL_{50}; 48h > 100$  mg L<sup>-1</sup>), foram determinadas as concentrações para o ensaio de toxicidade crônica seguindo os

quocientes: CL50/5 (1,0 mg L<sup>-1</sup>), CL50/2 (50,0 mg L<sup>-1</sup>); o próprio valor da CL50 (100,0 mg L<sup>-1</sup>). Considerando que a CL50; 48h foi maior que 100 mg L<sup>-1</sup> e o experimento foi encerrado nesta concentração de AZT, as concentrações utilizadas nos testes de toxicidade crônica foram 1, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> de AZT. A azitromicina foi previamente diluída em etanol (1,0 mL etanol: 1,0 g AZT) e, então, foram constituídos dois controles (sem adição do antimicrobiano): um controle negativo e um controle positivo em que foi adicionado etanol (0,01 %). Os peixes foram alimentados a cada 48h, com 2,5 % do valor de sua biomassa inicial.

As características físicas e químicas da água foram mantidas semelhante às da água de aclimação, dos testes de sensibilidade e de toxicidade aguda. As mensurações das variáveis para avaliação da qualidade de água foram efetuadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 11 e 14 após início do ensaio, nos períodos da manhã e tarde. A concentração de oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>), pH, temperatura da água (°C) e condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) foram medidas utilizando-se um sistema YSI 556 MPS (YellowSpring Co<sup>®</sup>, Estados Unidos da América).

### **3.3. Indução de infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e eficácia**

A indução de infecção e a eficácia de controle da bactéria pelo AZT foi efetuada utilizando-se cepas de *A. hydrophila*, cedidas pela Prevet<sup>®</sup> Sanidade Aquícola. Para este estudo foi utilizado exemplares jovens de *O. niloticus* com peso entre  $85 \pm 15$  g. O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado (DIC) em mesocosmos de 100 L com fluxo de água mantido constante em  $12 \text{ mL s}^{-1}$ . O ensaio foi constituído com seis tratamentos e três réplicas (20 peixes/ réplica). Os tratamentos foram: controle sadio (CS), animais não infectados e alimentados com ração não medicada com AZT; controle salina (CSAL), controle negativo (CN) do procedimento

de infecção, inoculado com solução salina 0,85%, não infectado e alimentado com ração não medicada com AZT; controle ração medicada com AZT (CRM), animais não infectados e alimentados com ração medicada ( $125 \text{ mg kg}^{-1}$ ); infectado não-tratado (INTR), animais infectados e alimentados com ração não medicada e, infectado tratado com  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  AZT (AZT100) e infectado tratado com  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  (AZT125) na ração (peixes infectados e alimentados com ração medicada com AZT). As características físicas e químicas da água foram mantidas semelhante às dos ensaios anteriores. A infecção foi induzida inoculando via injeção intramuscular, subcutânea e intracelomática,  $1,0 \text{ mL}$  de concentrado de  $6,2 \times 10^{11}$  bactéria  $\text{mL}^{-1}$  (escala McFarland) nos grupos de peixes que foram submetidos à infecção por *A. hydrophila* (INTR, AZT100 e AZT125). Diariamente a mortalidade foi avaliada e os peixes mortos retirados das unidades experimentais.

### **3.3.1. Obtenção do inóculo de *Aeromonas***

A cepa de *A. hydrophila* foi cultivada, no laboratório NEPEAM, em meio de enriquecimento específico constituído de caldo soja triptona (TSB). Após 24 h de cultivo, as culturas foram centrifugadas em TSB a  $1800 \text{ xg}$ , o sobrenadante foi descartado e o pellet (formado pelo aglomerado de bactérias) foi ressuscitado em solução salina 0,85 % no mesmo volume da solução de cultivo ( $9,0 \text{ mL}$ ). O inóculo foi obtido após a centrifugação das culturas, o sobrenadante foi descartado e o pellet diluído em solução salina a 0,85 %. Posteriormente,  $0,1 \text{ mL}$  de cada diluição foi colocado em placas de ágar vermelho contendo fenol-amido-ampicilina para *A. hydrophila*; após 24 h de crescimento em incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) com fotoperíodo de 12 horas de luz a  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ , foi realizada a contagem e conversão do número

de UFC (unidade formadora de colônia) por mL. A diluição escolhida para inóculo foi a que continha a quantidade desejada de UFC/ mL ( $6,2 \times 10^{11}$  bactéria mL<sup>-1</sup>).

### **3.3.2. Confirmação da infecção de tilápias por *Aeromonas***

Amostras assépticas de fígado e rins de peixes (n = 5 cada amostragem) inoculados com *Aeromonas hydrophila*, foram coletadas por meio de “swab”, 3 e 5 dias após o início do tratamento e foram incubadas em TSB durante 24 horas, a 28 °C. As culturas obtidas foram repicadas em ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina e as colônias com características de *Aeromonas* (colônias amareladas com halo transparente) foram coletadas, efetuados esfregaços para a realização dos testes fenotípicos e identificação de *Aeromonas* para confirmação da infecção.

Os esfregaços foram corados com a técnica de Gram; as culturas que apresentavam bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas, Gram negativas foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (SAAD et al., 1995) e encubadas a 28 °C por 24 h. As culturas que apresentaram reação ácida com coloração amarelada, com ou sem formação de gás, foram novamente repicadas em ágar tripticase-soja (TSA). Posteriormente, foram submetidas às provas de catalase e oxidase para identificação, seguindo esquema de caracterização adotado por POPOFF (1984).

A prova da catalase foi realizada pela reação do peróxido de hidrogênio com a colônia de bactéria, sendo o resultado considerado positivo sempre que ocorreu despreendimento de oxigênio dessa reação. A prova da oxidase foi realizada utilizando esfregaços das culturas de bactérias, com a utilização de alça de platina, em fitas para prova da oxidase adquiridas prontas para uso (Newprov®). As culturas cujos esfregaços apresentaram coloração púrpura após alguns segundos foram consideradas positivas. Os



cultivos que resultaram em catalase e oxidase positiva foram considerados como de *Aeromonas* sp.

### **3.3.3. Preparação da ração medicada com AZT**

Para o tratamento da infecção por *Aeromonas*, foi utilizada a ração PoliNutri® com 32 % de proteína bruta e, em cada quilo, foram adicionados, de forma homogênea, 100 e 125 mg de AZT dissolvida em 2 % de óleo vegetal. Em seguida, a ração foi mantida a 25 °C para secagem. Conforme definido em testes preliminares, 24 horas após o inóculo de bactérias, foi iniciado o tratamento com AZT; a ração medicada foi administrada nos tratamentos correspondentes AZT100 e AZT125 durante cinco dias, no período da manhã e tarde, na quantidade total de 2 % da massa corpórea.

### **3.4. Coleta de amostras para análise bioquímica e histológica**

Ao final do ensaio de toxicidade crônica e de eficácia de controle de *Aeromonas*, uma amostra de sangue foi coletada dos peixes, via punção caudal, para determinação das variáveis sanguíneas e osmolalidade plasmática. No experimento de eficácia de controle das *Aeromonas*, foi coletado sangue também para a determinação do *burst* respiratório. Soro sanguíneo foi coletado e congelado a -80 °C para análise da lisozima e sistema complemento. Posteriormente, os peixes foram mortos por secção da medula e as brânquias, o fígado e os rins foram removidos. Sub-amostras destes órgãos foram congeladas a -80 °C para análises bioquímicas e outras foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, por 24 horas, para análises histopatológicas.

### 3.5. Variáveis hematológicas e osmolalidade plasmática

As variáveis hematológicas, número de eritrócitos (RBC), hematócrito (Hct) e hemoglobina (Hb) foram determinadas e, posteriormente, calculados os índices hematimétricos, quais sejam, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

O Hct (%) foi determinado pelo método de microhematócrito em tubo capilar heparinizado e centrifugação a 16128 xg (5 min) em centrífuga de microhematócrito FANEN, mod. 207/N. O número de eritrócitos ( $n \text{ mm}^{-3}$ ) foi estimado em câmara de Neubauer, utilizando 10  $\mu\text{L}$  de sangue em 2 mL de solução de formol-citrato; a concentração de Hb ( $\text{g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ ) foi determinada utilizando o método da cianometahemoglobina (reagente de Drabkin) com 10  $\mu\text{L}$  de sangue total e leitura em espectrofotômetro em 540 nm. Os valores de RBC, Hct e Hb foram utilizados para o cálculo dos índices hematimétricos: VCM, (fL), HCM ( $\text{pg cel}^{-1}$ ) e CHCM ( $\text{g dL}^{-1}$ ).

A contagem total e diferencial de leucócitos (monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, leucócitos imaturos) e trombócitos foram efetuadas em extensões sanguíneas coradas com MGGW (May Grünwald-Giemsa-Wright) pelo método de Rosenfeld (1947) sendo o número absoluto de leucócitos e de trombócitos estimado pelo método indireto (HRUBE e SMITH, 1998).

O sangue remanescente foi centrifugado, o plasma removido e a osmolalidade plasmática determinada, utilizando-se um semi-microsmômetro ( $\mu\text{OSMETTE PRECISION SYSTEM}$ ) que tem como base o ponto de congelamento expressa em  $\text{mOsmol kg}^{-1}$ .

### **3.6. Resposta imune inata**

A resposta imune inata dos peixes foi avaliada somente nos animais submetidos ao experimento de eficácia, uma vez que nesse experimento os mesmos foram desafiados a uma infecção.

#### **3.6.1. Concentração de lisozima**

A concentração de lisozima sérica foi determinada de acordo com Demers e Bayne (1997), com método baseado na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus*. Soluções padrão (0 – 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de lisozima de ovo de galinha (L6876, Sigma - Aldrich) que foram preparadas no momento da análise a partir de alíquota congelada, utilizando tampão fosfato de potássio 66 mM, pH 6,2. Em seguida, as diluições do padrão e 25 $\mu\text{L}$  da amostra foram colocadas em microplacas, em triplicata. Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (M3770, Sigma-Aldrich) preparada no mesmo tampão foi adicionada em cada poço. A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplaca (Molecular Devices) em 450 nm, a cada 20 segundos, durante 10 minutos, a temperatura controlada de aproximadamente 20 °C. Os resultados foram expressos utilizando-se os valores da variação de densidade óptica para cada volume de amostra *versus* o volume de lisozima da curva padrão. A equação de regressão linear da curva padrão de lisozima foi utilizada para determinar os níveis de lisozima sérica (ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

#### **3.6.2. Atividade hemolítica do Sistema Complemento**

A atividade hemolítica do complemento sérico foi determinada de acordo com a metodologia de Polhill et al. (1978), modificada por Ferriani et al. (1990) e descrita por Zanuzzo et al. (2015). No ensaio, foi utilizada uma suspensão de eritrócitos de coelhos

devidamente preparada e depois efetuada a leitura da mistura de trabalho em uma absorbância de 700 nm, por 10 minutos, em espectrofotômetro provido de banho a 37 °C (Hitachi U-2910). Para a leitura, foram utilizados 200 µL da amostra pipetados junto com 400 µL da mistura de trabalho em uma cubeta. A leitura foi realizada a cada 20 segundos durante 30 minutos. A atividade hemolítica do sistema complemento, para cada amostra, foi medida como o tempo (segundos) necessário para reduzir a densidade óptica inicial em 50%.

### **3.6.3. Atividade respiratória dos leucócitos**

A atividade respiratória dos leucócitos (*burst* respiratório) foi determinada segundo protocolo descrito por Anderson e Siwichi (1994) e modificado por BILLER (2013). As espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo *burst* respiratório dos leucócitos foram determinadas por ensaio colorimétrico, baseado na redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT) que formam grânulos de formazan, que são precipitados de material insolúvel e apresentam coloração escuro no interior dos fagócitos (KLEIN, 1990). Uma alíquota de 0,1 mL de sangue heparinizado foi colocada em tubos contendo 0,1 mL de NBT (Sigma, St. Louis, MO, USA). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25 °C. Após esse período, 50 µL da suspensão formada foi colocada em tubos de ensaio com 1 mL de n,n-dimetil-formamida (DMF, Sigma, St. Louis, MO, USA) e centrifugada a 3000 g por 5 min. O n,n-dimetil-formamida produz a lise da parede celular dos grânulos de formazan e assim libera na solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em 540 nm (SAHOO et al., 2005).

### **3.7. Biomarcadores de estresse oxidativo**

A atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GST, concentração de GSH, proteínas carboniladas e peróxidos de lipídeos foram analisadas no fígado dos animais submetidos à toxicidade crônica e aqueles submetidos ao ensaio de controle de eficácia da AZT. A concentração de proteína totais nos homogeneizados de tecidos utilizados nas determinações enzimáticas e não enzimáticas, foi quantificada segundo o método descrito de Bradford (BRADFORD, 1976) adaptado para leitura em microplaca (KRUGER, 1994). Foi utilizado Coomassie blue e a albumina bovina como padrão. A leitura em 595 nm foi efetuada em uma leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.) para determinação da atividade das enzimas.

#### **3.7.1. Atividade da Superóxido Desmutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido via sistema xantina/xantina oxidase, segundo a metodologia de McCORD E FRIDOVICH (1969). Em 285 µL da mistura reativa (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM; xantina 1mM; NaOH 0,001 M), foram adicionados 10 µl de xantina oxidase e 5 µL da amostra. As leituras foram feitas em 550 nm durante 1 min com 20 seg de intervalo entre cada leitura. Uma unidade de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo C, uma vez que a SOD dismuta o radical superóxido em H<sub>2</sub>O e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade da enzima foi expressa em U SODmin<sup>-1</sup> mgPt<sup>-1</sup>.

#### **3.7.2. Atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi mensurada pela avaliação do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como descrito por BEUTLER (1975).

A leitura é feita em espectrofotômetro em 240 nm. A redução da absorbância foi medida durante um minuto em cubeta contendo 1 mL de solução recém preparada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água destilada (30%), tampão (tris 1M, EDTA 5 mM) e 5µL de amostra. A reação foi iniciada com a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade da enzima foi expressa em µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizado min<sup>-1</sup> mgPt<sup>-1</sup>.

### **3.7.3. Atividade da glutathione peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi determinada pela reação da glutathione redutase e da oxidação do NADPH, utilizando-se o hidroperóxido como substrato. Para a determinação enzimática, foram adicionados aos poços de microplaca: 30 µL de Tris-EDTA 1 M pH 8,0; 6 µL GSH 1 mM; 30 µL glutathione redutase 10 U/mL; 30 µL de NADPH 2 mM; 114 µL de azida sódica 2,6 µM; 5 µL de homogeneizado diluído e 76 µL de água destilada para completar. Esta amostra foi pré-incubada por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 9 µL de t-butil hidroperóxido 7 mM. A oxidação do NADPH foi determinada durante 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos. O decréscimo da densidade óptica foi determinado contra um branco a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos é  $\epsilon_{0}=6,22.mM^{-1}.cm^{-1}$ . A atividade da enzima foi expressa em µM NADPH oxidado min<sup>-1</sup>mg Pt<sup>-1</sup>.

### **3.7.4. Atividade da glutathione-S-transferase (GST)**

A glutathione-S-transferase catalisa a conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) produzindo, assim, um composto detectado em 340 nm. Para a leitura, foi montada uma mistura reativa com CDNB (0,5M), GSH (25mM) e tampão fosfato de potássio 0,1M. A essa mistura era adicionado 20µL das amostras. A leitura foi realizada por quatro minutos em intervalos de 30 segundos. A atividade da

GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 nM de produto.min<sup>-1</sup>.mg.Pt<sup>-1</sup>, e o coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 9,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (adaptado de HABIG e JAKOBI, 1981).

### **3.7.5. Determinação da Glutathione (GSH)**

O nível de GSH foi determinado com base na reação do naftalenedicarboxialdeído (NDA) (10 mM) com a GSH, formando um composto fluorescente (WHITE et al., 2003). Para a análise, utiliza-se 20 µL das amostras tratadas com ácido tricloroacético 12% (1:1) e centrifugadas para precipitar proteínas. O sobrenadante resultante e uma solução de tampão fosfato de potássio contendo o naftalenedicarboxialdeído foram pipetados em uma placa branca. Após incubação de 30 minutos no escuro à temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de fluorescência a  $\lambda= 472$  nm de excitação e  $\lambda=528$  nm de emissão e o resultado expresso em µg de GSH mg Pt<sup>-1</sup>.

### **3.7.6. Determinação de proteína carbonilada**

O nível de proteína carbonilada foi determinado utilizando a 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DPNH) que reage com proteínas carboniladas (apenas do tipo aldeído e cetona) formando dinitrofenil hidrazonas (DNPH) que são detectadas em 340 nm. Foi calculada de acordo com o método de Levine et al., 1994, adaptado, que consiste em montar duas séries de amostras, uma série sendo o branco, a qual recebe somente ácido clorídrico (HCl) a 2M e a outra série recebe meio de reação contendo a DPNH e HCl, todas contendo as amostras a serem analisadas.

Foi adicionado 500 uL de HCl 2M aos brancos (200 uL) e 500 uL de meio de reação aos tubos teste (200 uL), incubado a 30-37°C por 90 min e, logo após, os tubos

foram colocados em gelo. Foi adicionado 700 uL de solução de ácido tricloroacético, agitado em vortex e centrifugado a 9.000 g, a 4°C por 10 minutos e descartado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado em 1,0 mL de solução de etanol-acetato de etila gelado, repetindo o procedimento de agitação, seguido de centrifugação por mais duas vezes. Terminado esse procedimento, o precipitado foi ressuspensionado em 500 uL de solução de hidrocloreto de guanidina, agitado e centrifugado novamente, porém, nesta etapa, por 3 minutos. Por fim, foi pipetado 200 uL das amostras em microplaca, sendo a leitura realizada a  $\lambda = 340$  nm e os resultados foram expressos em nM de carbonilas.mg.Pt<sup>-1</sup>.

### **3.7.7. Determinação de peróxidos de lipídeos (LPO)**

Os níveis de lipoperoxidação foram quantificados utilizando-se o método FOX (“Ferrous Oxidation-Xylenol Orange”), descrito por Jiang et al. (1992), que consiste na oxidação do Fe<sup>+2</sup> (sulfato ferroso amoniacal) a Fe<sup>+3</sup> pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de xilenol laranja. Cem microlitros de amostras foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA) 12% e incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com 900 µL de mistura reativa contendo 100 µM de alaranjado de xilenol, 250 µM de FeSO<sub>4</sub>, 25 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 4 mM de butil hidroxitolueno diluídos em metanol 90% (v/v). As leituras de absorvância foram feitas em 560 nm. Os níveis de LPO foram expressos em µM hidroperóxido de cumeno por mg de proteína.

### **3.8. Análises morfofuncionais**

As análises morfológicas foram efetuadas nas brânquias, fígado e rins. Amostras de brânquias, fígado e rim, foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, foram desidratadas em série crescentes de etanol, permanecendo por 1h



em álcool em diferentes diluições (70, 80, 90 e 95 %), perfazendo um total de 4 horas. Após isso, foram imersas em mistura de etanol 95 % com metacrilato (Historesina Leica®) por 4 horas, embebidas durante a noite em metacrilato (Historesina Leica) e, posteriormente, incluídas em metacrilato.

A seguir, foram efetuados cortes histológicos com 3 µm em sequência semi-seriada de 1 corte para 100 µm de descarte, em um micrótomo automático (Microm HM 360) com auxílio de navalhas de vidro descartáveis. Os cortes foram corados com azul de Toluidina (brânquias), azul de Toluidina e fucsina básica (fígado e rim).

As análises histopatológicas foram efetuadas de acordo com Cerqueira e Fernandes (2002), seguindo a metodologia descrita por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) com algumas modificações (Tabelas 1, 2 e 3). Os cortes foram analisados em microscópio de luz (Olympus BX51) em objetiva de 40x e 100x. As imagens foram fotodocumentadas com câmara de vídeo acoplada a um computador, utilizando-se o software Motic Images Plus 2.0.

O tipo e a frequência de alterações histopatológicas foram registrados, sendo os Índices de Alterações Histopatológicas (IAH) calculados para cada órgão e condição experimental. As alterações foram classificadas em três estágios progressivos baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões: estágio I, lesões não muito severas e que não afetam o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais; estágio II, lesões moderadamente severas e que podem afetar o funcionamento do órgão, podem ser irreversíveis, porém, em geral são pontuais; e estágio III, lesões muito severas e normalmente irreversíveis onde o funcionamento do órgão fica prejudicado (Tabelas 1, 2 e 3). O IAH (I) é o resultado da somatória dos pesos dos diferentes estágios (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994) e calculado segundo a fórmula abaixo:

$$I = 10^0 \sum_{i=1}^a a_i + 10^1 \sum_{i=1}^b b_i + 10^2 \sum_{i=1}^c c_i,$$

em que a = alterações de estágio I, b = alterações de estágio II e c = alterações de estágio III; multiplicada por  $10^0$ ,  $10^1$  e  $10^2$ , respectivamente, que corresponde ao fator de importância da lesão.

O índice de alterações histopatológicas é dividido em categorias: 0-10 estrutura normal do órgão, 11-20 danos leves a moderado, 21-50 alterações moderadas a severas no órgão, 51-100 alterações severas no órgão e >100 danos irreparáveis no órgão.

A avaliação de glicogênio no fígado foi efetuada por histoquímica para carboidratos utilizando ácido periódico e reativo de Schiff (PAS) e quantificado de acordo com a intensidade de coloração: 0, células não coradas; 1, células pouco coradas; 2, células razoavelmente coradas e 3, células muito coradas.

**Tabela 1.** Alterações histopatológicas em brônquias e estágios com base no grau de possibilidade de restauração das lesões.

ALTERAÇÕES BRANQUIAIS			
	Estágio I	Estágio II	Estágio III
BRÂNQUIAS	Hipertrofia do epitélio lamelar		
	Hiperplasia do epitélio lamelar		
	Congestão vascular		
	Dilatação capilar		
	Descolamento epitelial	Aneurisma lamelar	Necrose Focal
	Constrição capilar	Ruptura Epitelial (hemorragia)	Necrose Total
	Proliferação de células cloreto		
	Proliferação de células mucosas		
	Fusão das lamelas		
	Edema		

**Tabela 2.** Alterações histopatológicas em fígado e estágios com base no grau de possibilidade de restauração das lesões.

ALTERAÇÕES HEPÁTICAS			
	Estágio I	Estágio II	Estágio III
FÍGADO	Hipertrofia nuclear / celular	Vacuolização nuclear	
	Atrofia nuclear / celular	Degeneração nuclear / citoplasmática	
	Aumento da frequência do número de vasos	Núcleos Picnóticos	
	Deformação do contorno nuclear / celular	Ausência de nucléolo / núcleo	Necrose Focal
	Núcleos na periferia da célula	Rompimento celular	Necrose Total
	Desarranjo dos cordões hepáticos	Estagnação biliar	
	Presença de melanomacrófagos	Ruptura de vasos	
	Vacuolização citoplasmática	Congestão	
	Grânulos Eosinófilos		

**Tabela 3.** Alterações histopatológicas em rim e estágios com base no grau de possibilidade de restauração das lesões.

ALTERAÇÕES RENAIS			
	Estágio I	Estágio II	Estágio III
ALTERAÇÕES TUBULARES	Hipertrofia nuclear / celular	Rompimento celular	
	Vacuolização celular	Degeneração granular / hialina	
	Dilatação da luz tubular	Oclusão da luz tubular	Necrose
	Tubos em regeneração	Degeneração tubular	
		Novos nefrons	
ALTERAÇÕES GLOMERULARES	Dilatação dos capilares	Redução/aumento do espaço de Bowman	
	Espessamento do endotélio capilar	Presença de hemácias no espaço de Bowman	Necrose
	Aumento do volume glomerular	Hemorragia	
		Degeneração tecido	

### 3.9. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão. Análise de variância (paramétrica ou não paramétrica, dependendo da distribuição normal e homogeneidade de variância) para determinar as diferenças entre os grupos experimentais e o pós-teste Tukey foi aplicado sempre que diferenças foram detectadas. As análises foram efetuadas utilizando o programa GraphPad InStat Versão 3.0 e as diferenças foram consideradas significantes quando  $P < 0,05$  entre os tratamentos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Toxicidade aguda

Durante o ensaio de toxicidade aguda, não ocorreu diferença significativa nas variáveis de qualidade de água (Tabela 4) e também não ocorreu mortalidade dos peixes expostos ao AZT em nenhuma das concentrações testadas. Assim, a concentração testada limite foi de 100 mg L<sup>-1</sup> AZT, os testes foram encerrados, uma vez que, esta concentração é considerada limite nos testes de toxicidade aguda (OECD, 2009), indicando que o organismo teste empregado no estudo não pertence ao grupo mais sensível para substância química testada. Assim, concentração letal 50 % (CL50; 48h) da AZT para a tilápia foi > 100 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.** Valores médios ( $\pm$  DP) das características físicas e químicas da água durante o ensaio de toxicidade aguda da azitromicina.

Concentração AZT (mg L <sup>-1</sup> )	Temperatura °C	O <sub>2</sub> D mg L <sup>-1</sup>	pH	Condutividade $\mu$ S cm <sup>-1</sup>
<b>0,0</b>	24,5 $\pm$ 0,1	3,83 $\pm$ 0,51	7,7 $\pm$ 0	190,8 $\pm$ 2,61
<b>25,0</b>	24,6 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,53	7,9 $\pm$ 0,10	188,63 $\pm$ 4,58
<b>50,0</b>	24,6 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,69	8,02 $\pm$ 0,19	191,76 $\pm$ 6,67
<b>75,0</b>	24,6 $\pm$ 0,2	5,13 $\pm$ 0,25	8,15 $\pm$ 0,23	193,7 $\pm$ 8,25
<b>100,0</b>	24,6 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,46	8,21 $\pm$ 0,19	195,4 $\pm$ 8,89

### 4.2. Toxicidade crônica

As concentrações subletais de AZT utilizadas nos testes de toxicidade crônica, definidas a partir dos testes de toxicidade aguda, foram subletais e, durante o experimento (14 dias), não ocorreu mortalidade de animais.

Os valores médios das características físicas e químicas da água estão expostos na Tabela 5. Não ocorreu diferença significativa entre os valores durante a realização do ensaio. Os peixes não apresentaram sinais de intoxicação.

**Tabela 5.** Valores médios ( $\pm$  DP) das características físicas e químicas da água durante o ensaio de toxicidade crônica da azitromicina. Horário das medições: Manhã – 9h e tarde – 16h.

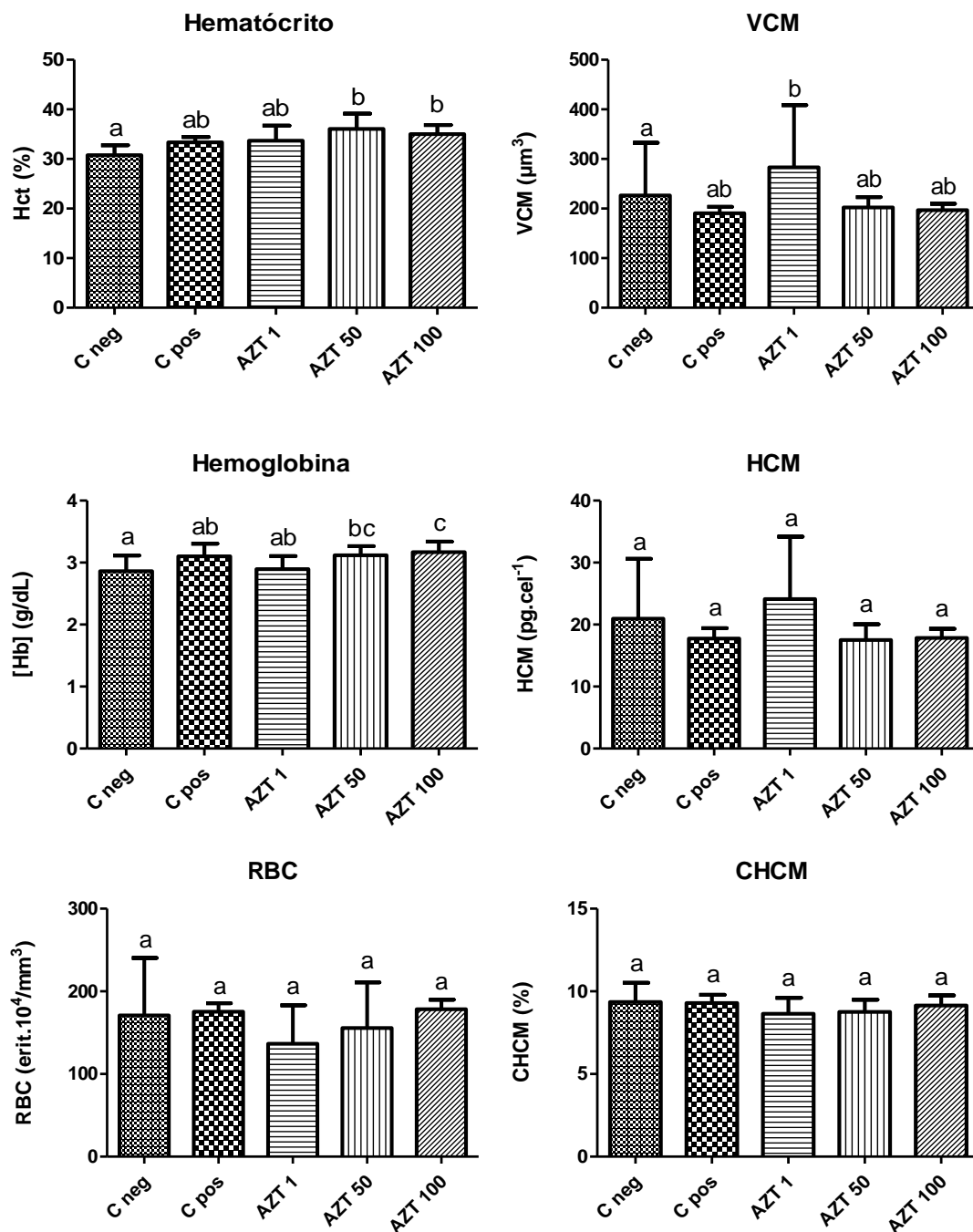
Concentração AZT (mg L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)		O <sub>2</sub> D (mg L <sup>-1</sup> )		pH		Condutividade (μS cm <sup>-1</sup> )		Amônia (mg L <sup>-1</sup> )	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
<b>0,0</b>	25,74 $\pm$ 1,56	27,47 $\pm$ 1,22	5,56 $\pm$ 0,56	6,87 $\pm$ 1,10	8,3 $\pm$ 0,13	8,71 $\pm$ 0,24	178,74 $\pm$ 20,9	188,74 $\pm$ 9,61	0,32 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,03
<b>0,0 + etanol</b>	26,56 $\pm$ 1,44	28,31 $\pm$ 1,56	4,75 $\pm$ 0,80	6,11 $\pm$ 1,21	8,0 $\pm$ 0,2	8,67 $\pm$ 0,2	191,89 $\pm$ 11,64	198,38 $\pm$ 11,25	0,25 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,05
<b>1,0</b>	25,87 $\pm$ 1,56	27,54 $\pm$ 1,23	5,04 $\pm$ 0,46	4,93 $\pm$ 0,25	8,1 $\pm$ 0,18	8,25 $\pm$ 0,06	216,2 $\pm$ 32,67	224,19 $\pm$ 34,82	0,30 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,05
<b>50,0</b>	26,17 $\pm$ 1,6	28,25 $\pm$ 1,28	4,40 $\pm$ 1,06	3,43 $\pm$ 0,83	8,1 $\pm$ 0,33	8,06 $\pm$ 0,08	234,03 $\pm$ 38,78	249,45 $\pm$ 40,25	0,37 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,05
<b>100,0</b>	26,09 $\pm$ 1,48	28,14 $\pm$ 1,3	4,02 $\pm$ 0,85	3,25 $\pm$ 0,74	8,2 $\pm$ 0,32	8,05 $\pm$ 0,08	291,9 $\pm$ 35,18	241,41 $\pm$ 31,53	0,34 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,02

#### 4.2.1. Variáveis hematológicas

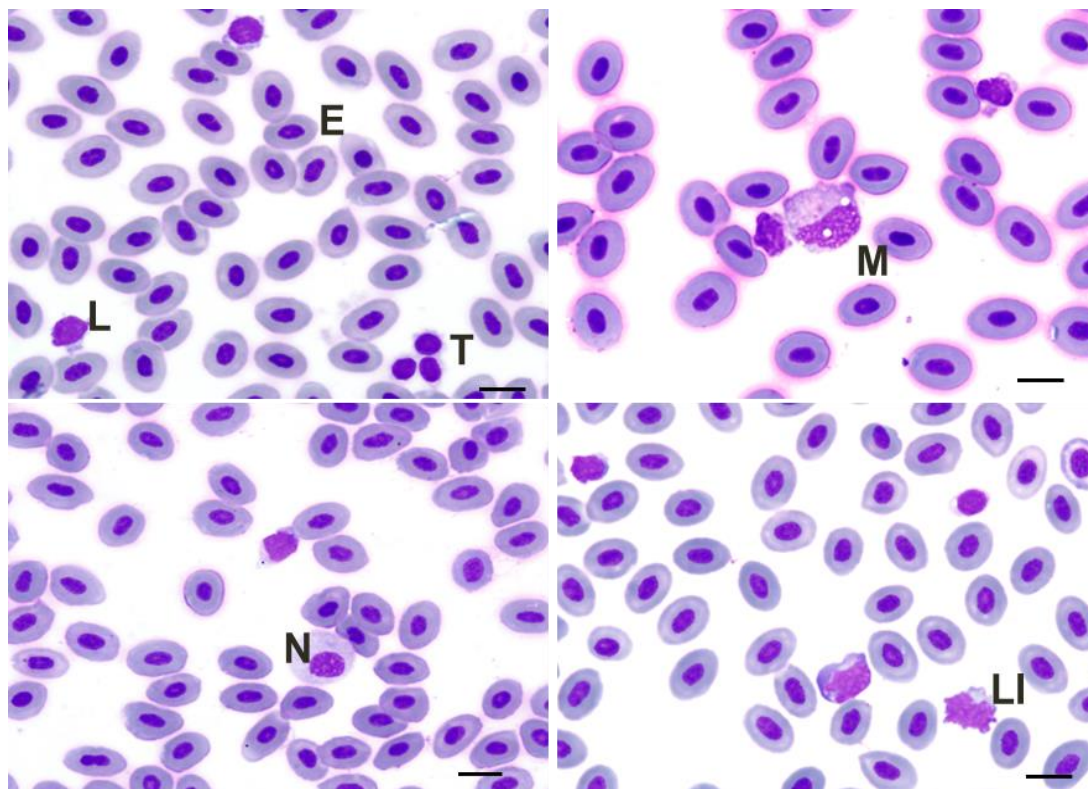
Após a exposição crônica, o Hct e concentração de Hb aumentaram significativamente em peixes expostos a 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> de AZT em relação ao controle negativo, Para o número de eritrócitos não ocorreu alteração (Figura 3). O aumento do Hct e Hb resultou em aumento do VCM, sem alteração no HCM e CHCM (Figura 3).

O número de leucócitos e trombócitos, no sangue periférico de *O. niloticus* (Figura 4), aumentou significativamente nos animais expostos a 100 mg L<sup>-1</sup> de AZT. O número de trombócitos do controle positivo (etanol) foi similar ao dos animais expostos a 100 mg L<sup>-1</sup> de AZT (Tabela 6). A porcentagem de linfócitos foi maior que os demais leucócitos (monócitos e neutrófilos e leucócitos imaturos) e não diferiu do grupo controle negativo nos animais expostos ao AZT. A porcentagem média de monócitos variou de 6,6 a 9,1 % e não diferiu nos grupos expostos ao AZT, entretanto, a porcentagem média de neutrófilos, que variou de 5,4 a 18,5 % e foi mais alta nos animais expostos ao AZT. Não foram identificados basófilos e eosinófilos no sangue periférico de *O. niloticus*. A porcentagem diferencial de leucócitos imaturos não ultrapassou 10 % em todos os tratamentos, exceto no grupo controle positivo, em que atingiu 25 %.





**Figura 3.** Valores médios ( $\pm$  DP) das variáveis hematológicas de *Oreochromis niloticus* após exposição a azitromicina (AZT) em ensaio crônico (14 d). Hematócrito (Hct), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Fotomicrografias de células sanguíneas de *Oreochromis niloticus*. (E) Eritrócitos, (L) Linfócitos, (T) Trombócitos, (M) Monócitos, (N) Neutrófilos, (LI) Leucócitos imaturos. Barra de escala: 10 $\mu$ m

**Tabela 6.** Valores médios ( $\pm$  DP) de leucócitos e trombócitos (n 10<sup>3</sup>) e porcentagem diferencial de leucócitos de *Oreochromis niloticus* em ensaio crônico (14 dias).

Número	Cont Neg	Cont Pos	1 mg L <sup>-1</sup>	50 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>
<b>Leucócitos</b>	13,02 $\pm$ 7,57 a	11,49 $\pm$ 3,66 a	4,89 $\pm$ 3 a	8,59 $\pm$ 4,64 a	26,3 $\pm$ 11,15 b
<b>Trombócitos</b>	6,63 $\pm$ 5,16 ac	16,55 $\pm$ 3,36 cb	6,56 $\pm$ 5,75 a	15,25 $\pm$ 9,12 abc	18,8 $\pm$ 10,12 b
<b>Porcentagem</b>					
<b>Linfócitos</b>	78,6 $\pm$ 11,02 a	55,6 $\pm$ 19,87 b	66,8 $\pm$ 12,47 ab	73 $\pm$ 8,25 a	69,6 $\pm$ 7,96 ab
<b>Monócitos</b>	6,9 $\pm$ 3,28 a	6,6 $\pm$ 5,21 a	6,7 $\pm$ 4,64 a	7 $\pm$ 3,2 a	9,1 $\pm$ 2,92 a
<b>Basófilos</b>	0	0	0	0	0
<b>Eosinófilos</b>	0	0	0	0	0
<b>Neutrófilos</b>	5,4 $\pm$ 4,74 a	13,1 $\pm$ 5,1 ab	18,5 $\pm$ 10,86 b	15,1 $\pm$ 6,26 b	12,8 $\pm$ 5,11 ab
<b>Leucócitos Imaturos</b>	9,1 $\pm$ 6,08 a	24,7 $\pm$ 17,06 b	8 $\pm$ 3,6 a	4,9 $\pm$ 1,66 a	8,5 $\pm$ 6,13 a

As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (p<0,05).

A osmolalidade plasmática não diferiu significativamente entre os animais do grupo controle positivo e controle negativo, cujas médias ( $\pm$  DP) foram 270,6  $\pm$  5,9 e 283,2  $\pm$  14,8 mOsm kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Entretanto, nos animais expostos a AZT, a osmolalidade aumentou significativamente nos animais expostos as concentrações de

1,0; 50,0; e 100,0 mg L<sup>-1</sup> em relação ao controle negativo, cujas médias ( $\pm$  DP) foram 297,6  $\pm$  10,9; 301,9  $\pm$  12,9 e 295,2  $\pm$  12,5 mOsm kg<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando que a azitromicina pode ter interferido na concentração de íons totais do sangue (Tabela 7).

**Tabela 7.** Médias ( $\pm$  DP) de osmolalidade plasmática de *Oreochromis niloticus* submetido à azitromicina em ensaio crônico.

Variável	Cont Neg	Cont Pos	1,0 mg L <sup>-1</sup>	50 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>
Osmolalidade ( $\mu$ Osmol kg <sup>-1</sup> )	270,6 $\pm$ 5,9a	283,2 $\pm$ 14,77ab	297,6 $\pm$ 10,96b	301,9 $\pm$ 12,91b	295,2 $\pm$ 12,49b

As letras indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Histologia das brânquias

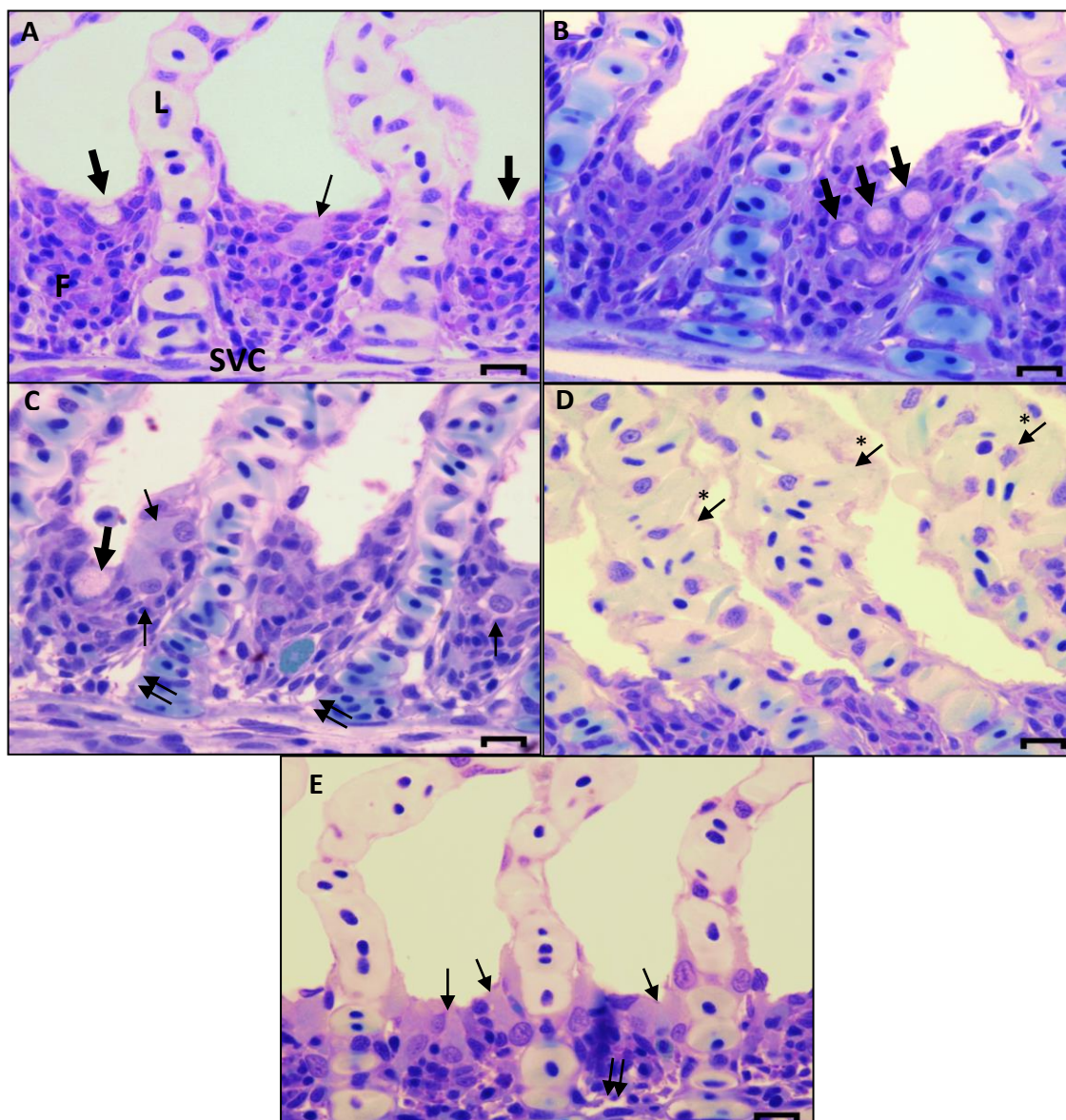
As brânquias dos animais do grupo controle apresentam organização estrutural semelhante à de outros teleósteos. O epitélio do filamento branquial é constituído de 7 a 10 camadas de células, sendo que, a mais externa é constituída principalmente por células pavimentosas; células de cloreto e mucosas encontram-se distribuídas entre as células pavimentosas (Figura 5A). O epitélio das lamelas (região efetivamente respiratória) é constituído por duas camadas de células epiteliais: a mais externa e pavimentosa e a mais interna que está apoiada na membrana basal é indiferenciada.

A exposição a AZT durante 14 dias causou alterações nas brânquias de tilápia (Tabela 8 e Figura 5). As mais frequentes neste órgão foram hipertrofia do epitélio do filamento próximo à origem da lamela (Fig. 5B), redução da espessura do epitélio (Fig. 5E), descolamento do epitélio lamelar e do filamento (Fig. 5C, E), congestão lamelar (Fig. 5D). O descolamento do epitélio do filamento foi caracterizado por um aumento do espaço intercelular das células na base do epitélio próximo a membrana basal (Fig. 5C, E). O IAH indicou estrutura normal do órgão em todos os tratamentos (Tabela 9).

**Tabela 8.** Características histológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* após exposição crônica (14 dias) a azitromicina (AZT).

Estágio	LESÕES	Concentração de AZT (mg L <sup>-1</sup> )				
		0,0	0,0 + etanol	1,0	50,0	100,0
I	Hipertrofia do epitélio das lamelas	++	++	++	+	++
	Espessura do epitélio do filamento	+	+	+	0	0
	Descolamento epitelial da lamela	+	0	+	0	+
	Descolamento epitelial do filamento	+	0	+	+	+
	Frequência de Células cloreto	++	+	++	++	++
	Frequência de Células mucosas	++	+	+	+	+
	Congestão lamelar	+	+	+	++	+
	Dilatação dos vasos sanguíneos	+	+	+	+	0

0 = ausente; + = pouco frequente. ++ = frequente. +++ = muito frequente



**Figura 5.** Fotomicrografias representativas de brânquias de *Oreochromis niloticus* expostas à azitromicina (AZT) em ensaio de toxicidade crônica (14 d). A) Tratamento controle negativo. SVC: seio venoso central, F: filamento, L: lamela; B) Tratamento controle positivo, C) Tratamento AZT1 (1 mg L<sup>-1</sup> AZT), D) Tratamento AZT50 (50 mg L<sup>-1</sup> AZT). E) Tratamento AZT100 (100 mg L<sup>-1</sup> AZT). Seta simples: células cloreto, seta grossa: células mucosa, seta dupla: aumento do espaço interlamelar, seta com asterisco: congestão vascular. Coloração: azul de toluidina. Barra de escala: 10µm.

**Tabela 9.** Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias de *Oreochromis niloticus* após ensaio crônico (14 dias).

Concentrações mg L <sup>-1</sup>	IAH
	Brânquias
0,0	4,75
0,0 + etanol	2,75
1,0	4,8
50,0	3,69
100,0	3,75

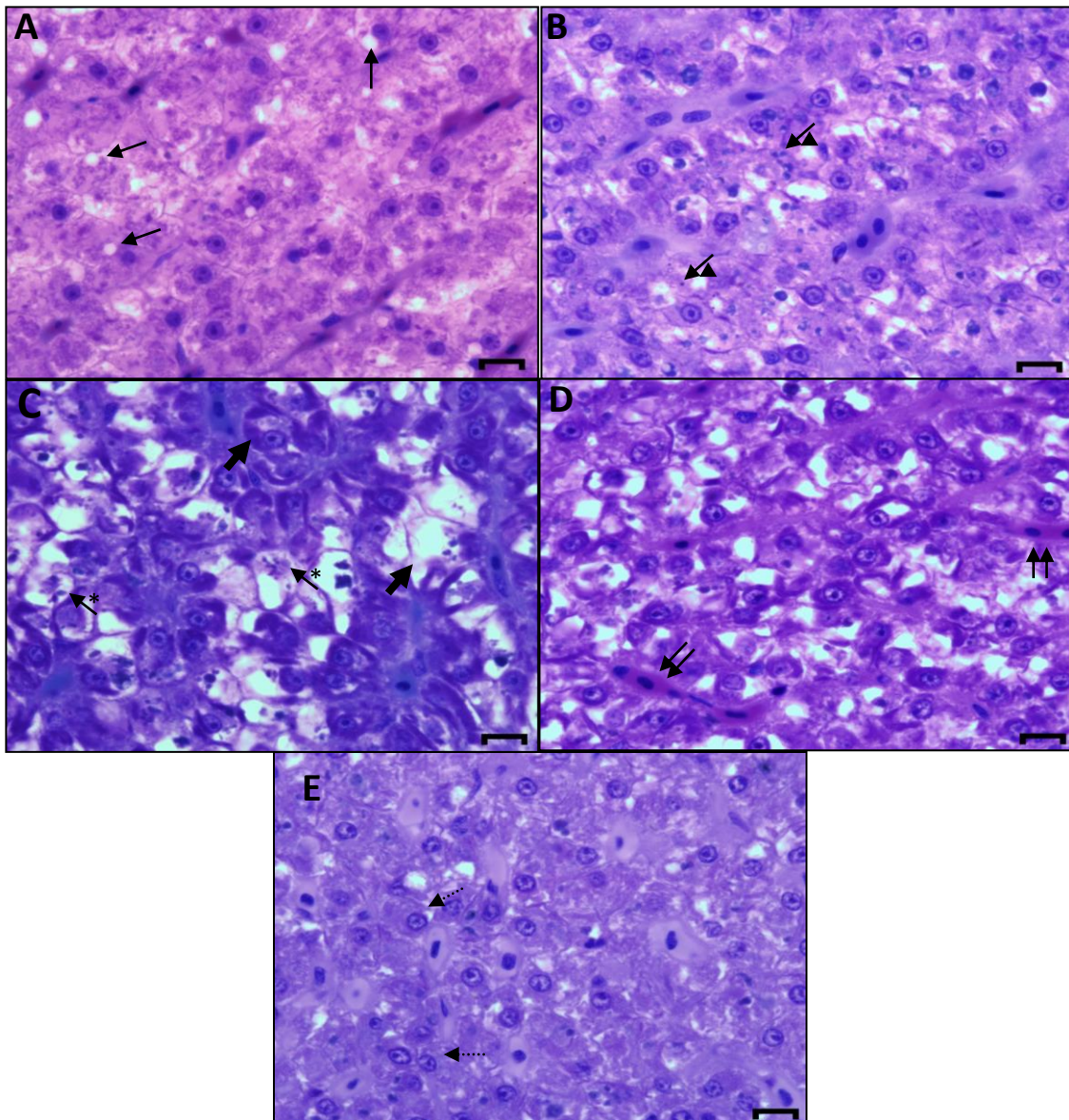
#### 4.2.3. Histologia e histoquímica do fígado

O fígado de tilápia possui hepatócitos organizado em arranjo cordonal ao longo dos capilares sinusóides. Estes têm forma hexagonal ou levemente arredondado com núcleo central (Figura 6A). A Tabela 10 apresenta as alterações identificadas e a frequência com que elas foram observadas no fígado dos animais do grupo controle e dos grupos expostos ao AZT.

**Tabela 10.** Histologia do fígado de *Oreochromis niloticus* em ensaio crônico (14 dias).

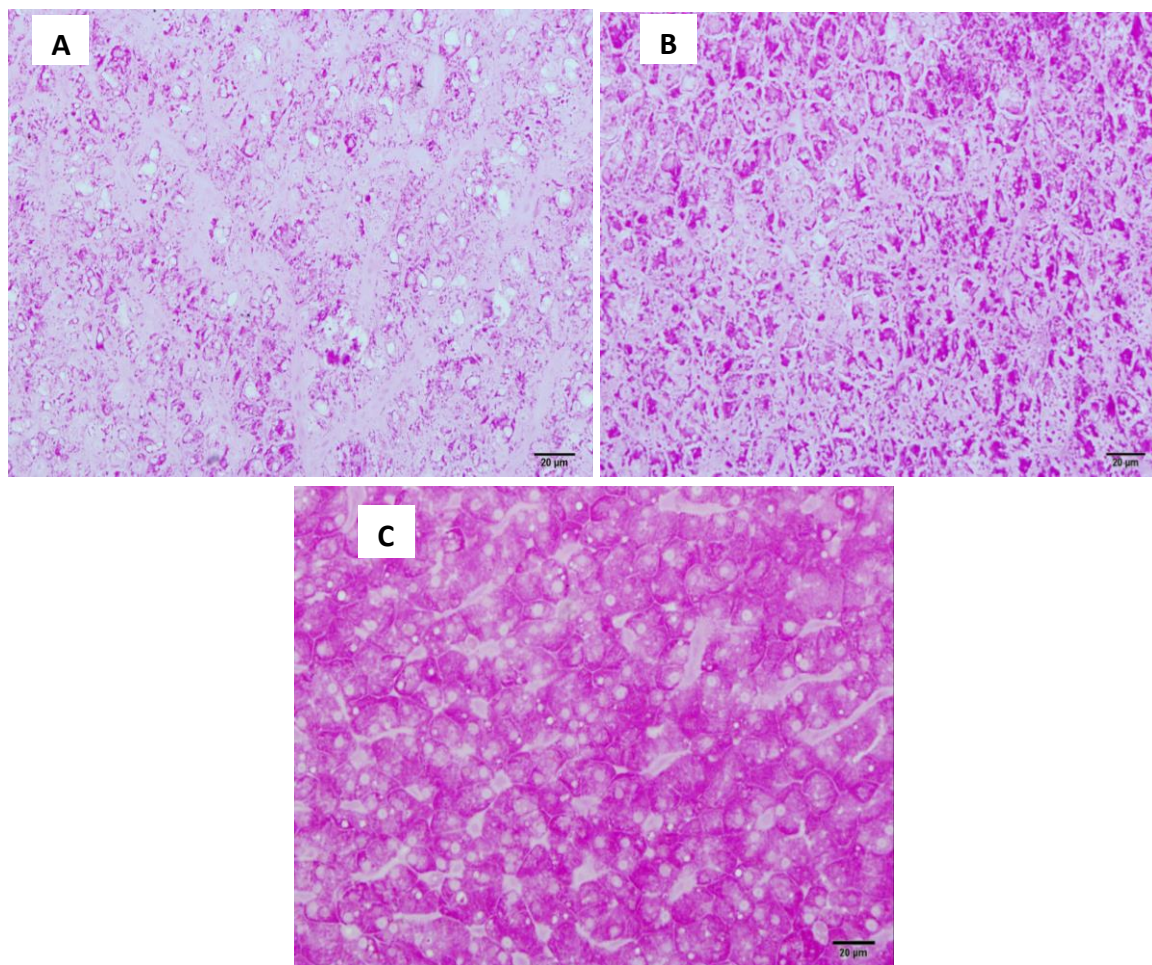
Estágio	LESÕES	Concentração de AZT (mg L <sup>-1</sup> )				
		0,0	0,0 + etanol	1,0	50,0	100,0
<b>I</b>	Hipertrofia celular	+	++	++	++	++
	Atrofia nuclear	0	0	+	+	+
	Aumento da frequência de vasos	0	0	+	++	+++
	Deformação celular	0	0	++	++	+++
	Núcleos periféricos	++	+++	+++	+++	+++
	Vacuolização citoplasmática	++	+++	+++	+	+
	Grânulos eosinófilos	++	+	++	+	+
	Lipídeos	0	0	0	+	++
<b>II</b>	Vacuolização nuclear	0	+	++	+	+
	Degeneração nuclear	0	0	+	+	+
	Degeneração citoplasmática	++	++	+++	++	++
	Ausência de núcleo	0	+	0	0	0
	Rompimento celular	0	++	++	0	0
	Congestão	0	0	0	++	+

0 = ausente; + = pouco frequente. ++ = frequente. +++ = muito frequente



**Figura 6.** Fotomicrografias representativas de fígado de *Oreochromis niloticus* exposto à azitromicina em ensaio de toxicidade crônica (14 d). **A)** Tratamento controle negativo, aspecto geral mostrando o arranjo dos hepatócitos em cordões. **B)** Tratamento controle positivo. **C)** Tratamento AZT1 (1,0 mg L<sup>-1</sup> AZT) **D)** Tratamento AZT50 (50,0 mg L<sup>-1</sup> AZT). **E)** Tratamento AZT100 (100,0 mg L<sup>-1</sup> AZT). Seta simples: vacuolização citoplasmática, seta com triângulo: grânulos eosinófilos, seta grossa: hipertrofia celular, seta com asterisco: degeneração nuclear, seta dupla: dilatação de sinusóides, seta pontilhada: deslocamento nuclear. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala: 10µm.





**Figura 7.** Fotomicrografia de fígado de *Oreochromis niloticus* expostos à azitromicina submetidos a teste de toxicidade crônica indicando colorações diferentes em resposta à reação de PAS. A) Pouco corado; B) Corado e C) Muito corado. Barra de escala: 20µm.

**Tabela 11.** Índice de alterações histopatológicas (IAH) de fígado de *Oreochromis niloticus* após ensaio crônico (14 dias).

Concentrações mg L <sup>-1</sup>	IAH
	Fígado
0,0	19,95
0,0 + etanol	47,5
1,0	57,45
50,0	52,15
100,0	41,3

As alterações mais frequentes no controle negativo (Figura 6A) foram hipertrofia celular, deslocamento nuclear e vacuolização citoplasmática. No controle positivo (com etanol) e em 1,0 mg L<sup>-1</sup>, também ocorreram estas alterações, porém, com maior frequência, além de degeneração citoplasmática (Figura 6B e C). Em 50,0 mg L<sup>-1</sup> também ocorreu aumento na frequência de vasos sanguíneos e lipídeos; e em 100,0 mg L<sup>-1</sup> também ocorreu degeneração nuclear (Figura 6 D e E).

A classificação do IAH (Tabela 11) para o controle negativo foi de danos leves a moderados no tecido e o valor 19,95. Para o controle positivo e para 100 mg L<sup>-1</sup> foi de alterações moderadas a severas e o valor do IAH foi 47,5 e 41,3, respectivamente; e para as concentrações de 1,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>, foi de alterações severas no tecido, com o valor de IAH de 57,45 e 52,15, respectivamente. Os valores constatados em todas as concentrações foram similares, com exceção do controle negativo, sem a presença do etanol, indicando que os efeitos podem ter sido causados pelo etanol, sem comprometimento ao funcionamento do órgão.

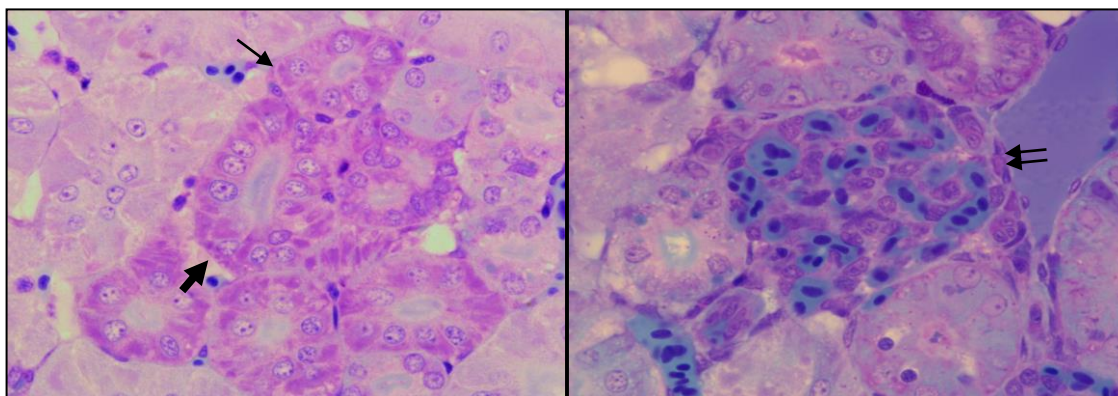
Não ocorreu diferença na intensidade das colorações PAS positivo nos hepatócitos entre as diferentes concentrações de AZT testadas. Em todos os tratamentos foram observados cortes de fígado pouco corados, corados e muito corados evidenciando uma grande variabilidade entre os animais em um mesmo tratamento quanto à reserva de glicogênio no fígado (Figura 7).

#### **4.2.4. Histologia do rim**

O rim posterior da tilápia é constituído por muitos néfrons e tecido linfoide intersticial. Os néfrons de rins de teleósteos são divididos em corpúsculo renal (glomérulos e cápsula de Bowman), túbulo renal e segmentos proximal e distal. O túbulo proximal apresentou epitélio com células cúbicas ciliadas e núcleos mais centrais. O túbulo distal apresentou células cúbicas ciliadas com núcleos mais basais. O

rim de *O niloticus* caracteriza-se por apresentar vários glomérulos juntos em cachos e outros isolados. O parênquima renal é constituído por túbulos, na sua maioria, proximais.

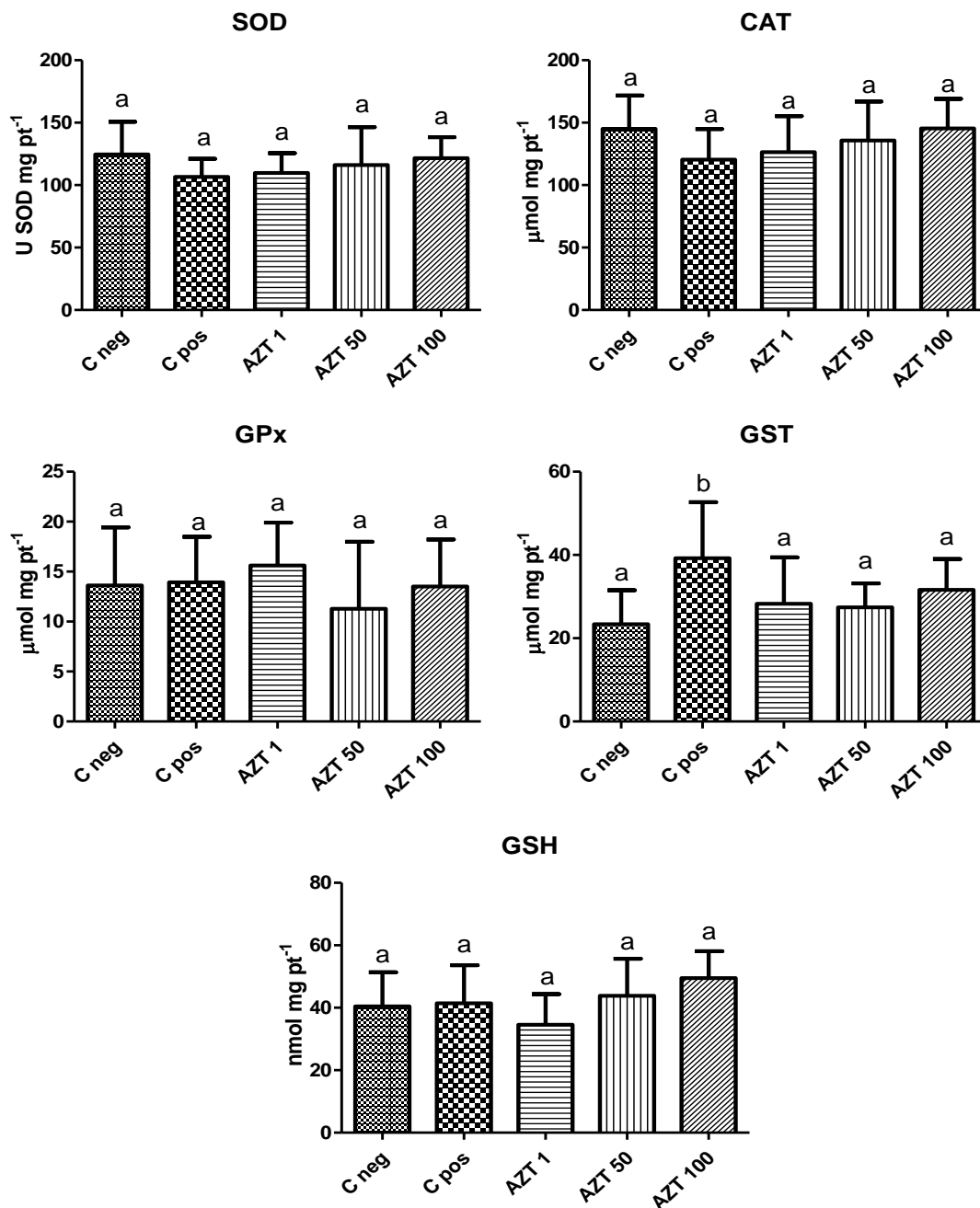
Os rins avaliados das tilápias submetidas ao teste de toxicidade crônica do AZT e o grupo controle não apresentaram nenhuma alteração patológica. O IAH dos rins de *O. niloticus* em todos os tratamentos indicou estrutura normal do órgão, sugerindo que a AZT não interfere no funcionamento normal deste órgão (Figura 8).



**Figura 8.** Fotomicrografias representativas de rim de *Oreochromis niloticus* expostos à azitromicina em ensaio de toxicidade crônica (14 d). As setas indicam as estruturas do rim. Seta simples: túbulo distal; Seta grossa: túbulo proximal; Seta dupla: glomérulo. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala: 10 $\mu$ m.

#### 4.2.5. Defesas antioxidantes no fígado

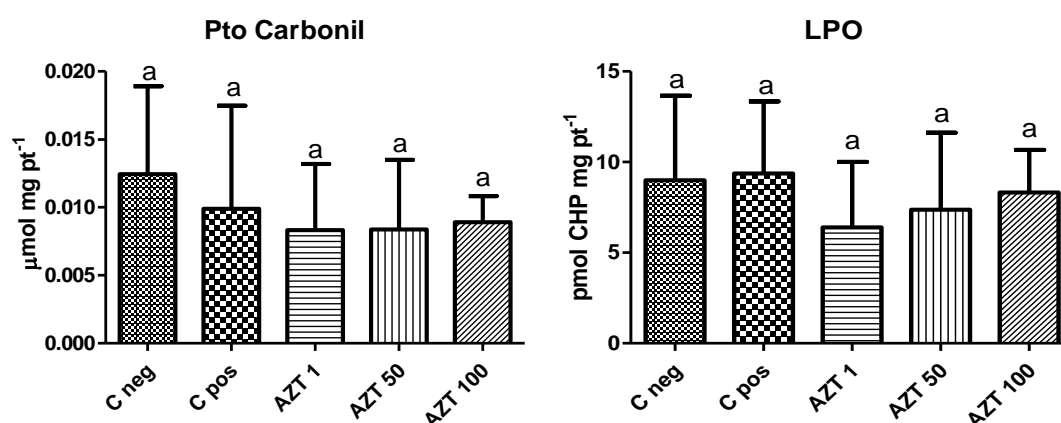
Os resultados da atividade das enzimas de defesas antioxidantes SOD, CAT e GPx, da enzima de biotransformação de fase II, a GST, e a concentração de GSH no fígado dos animais dos grupos controles e grupos expostos a AZT em ensaio crônico (Fig. 9). Apenas a atividade da GST aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) no controle positivo em relação aos outros tratamentos.



**Figura 9.** Valores médios ( $\pm$ DP) da atividade específica das enzimas (Superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutaciona peroxidase - GPx, glutaciona-S-transferase - GST) e nível de glutaciona (GSH) hepática de *Oreochromis niloticus* do grupo controles e grupos expostos à azitromicina em ensaio crônico (14 d). As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.6. Danos hepáticos

Na Figura 10 estão os valores do nível de proteína carbonilada e lipoperoxidação no fígado dos animais dos grupos controles e grupos expostos a AZT em ensaio crônico. Não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos.



**Figura 10.** Valores médios ( $\pm$  DP) da concentração de proteínas carboniladas e de hidroperóxido de cumeno no fígado de *Oreochromis niloticus* submetido à azitromicina após ensaio de toxicidade crônico (14 d). As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3. Eficácia da azitromicina em *O. niloticus* desafiada com *Aeromonas hydrophila*

Durante o período experimental, ocorreu 22% de mortalidade no tratamento infectado não-tratado. Nos demais tratamentos, não ocorreu mortalidade de peixes. Ocorreu uma evidente redução na contagem de bactérias isoladas do fígado dos peixes cinco dias após o início do tratamento, quando comparado o grupo infectado não-tratado com os tratamentos AZT 100 e AZT 125 (Tabela 12).

Durante o tratamento, ocorreu boa aceitabilidade da ração fornecida, uma vez que para favorecer o consumo total da ração, a mesma foi oferecida em quantidades pequenas (1% da biomassa de manhã e 1% de tarde), a ração era consumida total e rapidamente. Nos animais infectados não-tratados, foi observado um início de corrosão de nadadeira, sinal clínico da infecção por *Aeromonas* sp.

**Tabela 12.** Valores da contagem de colônias de *Aeromonas* sp. isoladas de fígado de *Oreochromis niloticus* após ensaio de eficácia (5 d).

	CS	CSAL	IÑTR	AZT 100	AZT 125
<b>Peixe 1</b>	11	17	1	3	62
<b>Peixe 2</b>	4	4	Incontável	4	0
<b>Peixe 3</b>	111	31	Incontável	347	0
<b>Peixe 4</b>	23	0	364	106	0
<b>Peixe 5</b>	13	288	Incontável	81	5

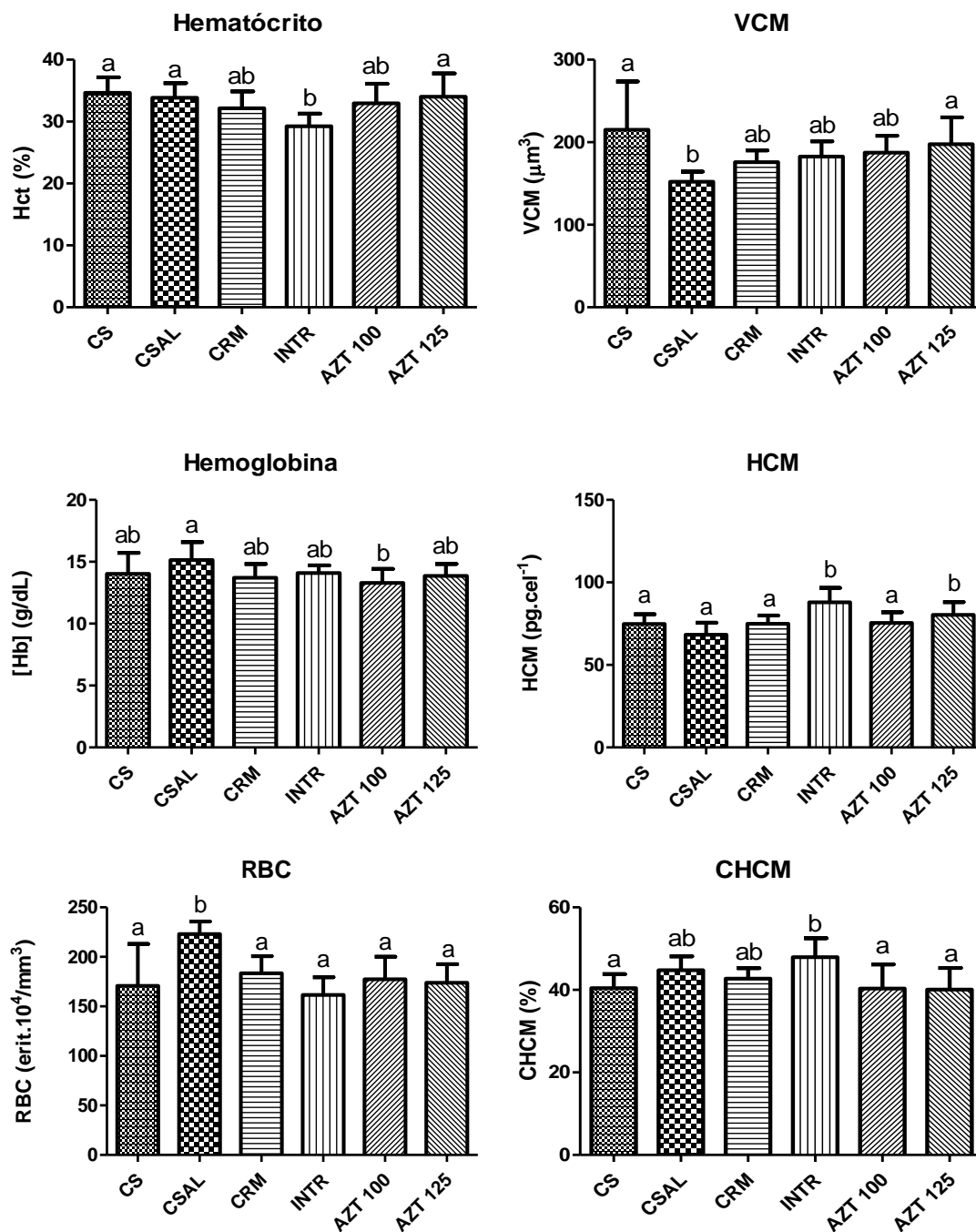
\* Incontável: Superposição das colônias de bactérias

As características físicas e químicas da água foram as mesmas da aclimação dos animais, uma vez que os tanques eram mantidos com fluxo aberto (oxigênio dissolvido  $> 4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ; condutividade  $180 \pm 20 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$ ;  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$ ; dureza variando entre 48 a  $58 \text{ mg de CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ).

#### **4.3.1. Variáveis hematológicas**

A Figura 11 mostra os valores médios das variáveis hematológicas. O Hct diminuiu no tratamento INTR em relação aos tratamentos CS, CSAL e AZT125; a concentração de Hb diminuiu no tratamento AZT100 e o RBC aumentou no tratamento CSAL em relação aos outros tratamentos. O VCM diminuiu no tratamento CSAL em relação ao CS e AZT125; o HCM e o CHCM aumentaram no tratamento INTR em relação aos demais tratamentos.

O número total de leucócitos e trombócitos e a porcentagem diferencial de leucócitos estão apresentados na Tabela 13. O número de trombócitos aumentou no tratamento AZT125 em relação ao CS e o número total de leucócitos não foi significativamente alterado. A porcentagem de linfócitos no tratamento INTR diminuiu e a porcentagem de neutrófilos aumentou.



**Figura 11.** Valores médios ( $\pm$  DP) das variáveis hematológicas de *Oreochromis niloticus* após exposição a azitromicina em ensaio de eficácia (5 d). Hematócrito (Hct), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos RBC de tilápia (*O. niloticus*) e cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular media (CHCM) após exposição a azitromicina em ensaio de eficácia (5 dias). As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 13.** Valores médios ( $\pm$  DP) de leucócitos e trombócitos ( $n \cdot 10^3$ ) e porcentagem diferencial de leucócitos de *Oreochromis niloticus* em ensaio de eficácia (5 d). As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

<b>Número</b>	<b>CS</b>	<b>CSAL</b>	<b>CRM</b>	<b>INTR</b>	<b>AZT 100</b>	<b>AZT 125</b>
<b>Leucócitos</b>	17,27 $\pm$ 8,06a	23,7 $\pm$ 10,64a	31,72 $\pm$ 20,95a	20,84 $\pm$ 9,92a	19,24 $\pm$ 9,01a	27,27 $\pm$ 12,7a
<b>Trombócitos</b>	23,34 $\pm$ 12,96a	37,14 $\pm$ 17,48ab	36,35 $\pm$ 10,92ab	28,32 $\pm$ 18,58ab	39,9 $\pm$ 11,79ab	43,15 $\pm$ 10,86b
<b>Porcentagem</b>						
<b>Linfócitos</b>	65,7 $\pm$ 16,18a	75,3 $\pm$ 9,76a	74,2 $\pm$ 20,07a	30,5 $\pm$ 23,81b	67,9 $\pm$ 28,08a	83,2 $\pm$ 6,21a
<b>Monócitos</b>	2,6 $\pm$ 1,9a	2,2 $\pm$ 1,4a	1,88 $\pm$ 1,6a	4,55 $\pm$ 3,91a	0,7 $\pm$ 0,9a	0,9 $\pm$ 1,1a
<b>Basófilos</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Eosinófilos</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Neutrófilos</b>	17,2 $\pm$ 14,57a	17,3 $\pm$ 10,59a	20,4 $\pm$ 18,05ab	40,3 $\pm$ 28,09b	17,5 $\pm$ 16,48a	13,7 $\pm$ 5,98a
<b>Leucócitos Imaturos</b>	12,4 $\pm$ 6,62a	5,2 $\pm$ 2,34b	2,7 $\pm$ 1,63b	2,7 $\pm$ 2,7b	3,9 $\pm$ 3,5b	2,2 $\pm$ 1,55b



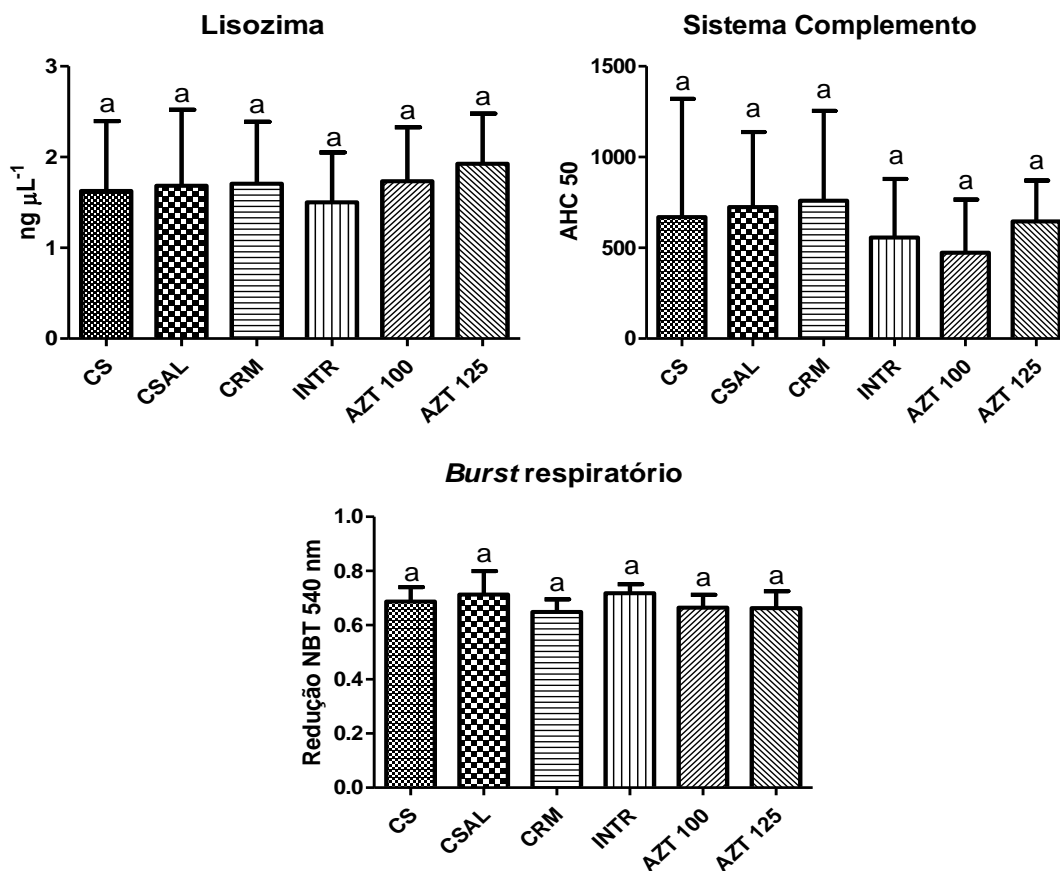
A osmolalidade plasmática não foi alterada em nenhum dos tratamentos e se manteve em torno de  $291,3 \pm 18,18$  mOsm  $\text{kg}^{-1}$  (Tabela 14).

**Tabela 14.** Médias ( $\pm$  DP) da osmolalidade plasmática de *Oreochromis niloticus* submetido à azitromicina em ensaio de eficácia (5d).

Variável	CS	CSAL	CRM	INTR	AZT 100	AZT 125
Osmolalidade	$284 \pm$	$289,2 \pm$	$303,4 \pm$	$281,2 \pm$	$292,4 \pm$	$299,6 \pm$
( $\mu\text{Osmol.Kg}^{-1}$ )	13,51	17,6	22,6	15,55	27,99	11,83

#### 4.3.2. Imunidade Inata

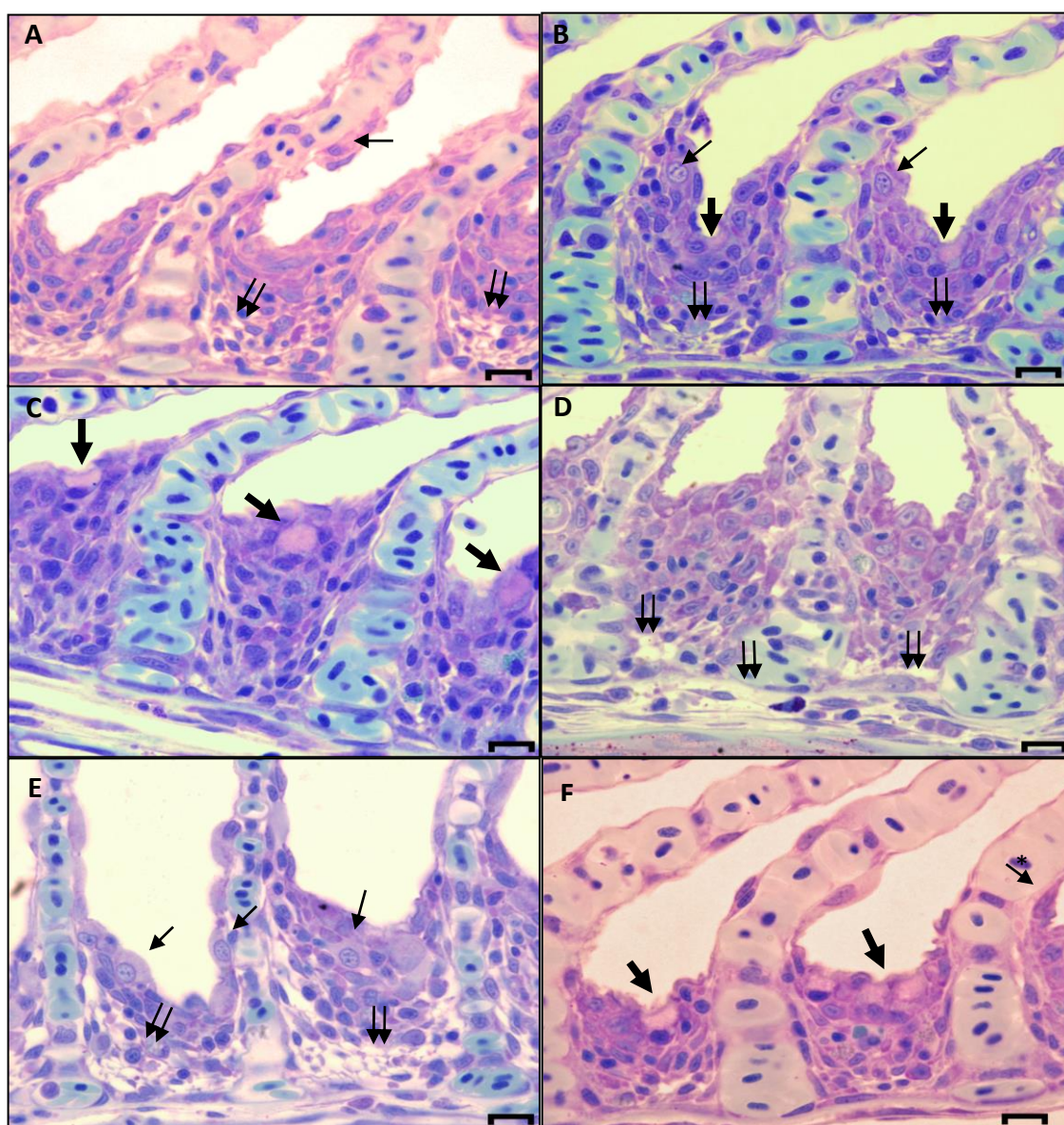
A resposta imune inata não foi alterada pela infecção e tratamento com o AZT. A Figura 12 mostra a concentração de lisozima, a atividade do sistema complementos e atividade respiratória de leucócitos em *O. niloticus*; não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos.



**Figura 12.** Lisozima, sistema complemento no soro e atividade (*burst*) respiratória dos leucócitos de *Oreochromis niloticus* submetido à azitromicina em ensaio de eficácia (5 dias).

### 4.3.3. Histopatologia das brânquias

As alterações histopatológicas mais frequentes em todos os tratamentos foram hipertrofia do epitélio lamelar, proliferação de células cloreto e células mucosas e edema próximo ao filamento (Figura 13, Tabela 15). O IAH para todas as concentrações, inclusive os controles indicaram estrutura e funcionamento normal do órgão (Tabela 16).



**Figura 13.** Fotomicrografias representativas de brânquias de *Oreochromis niloticus* submetidos ao ensaio de eficácia (5 d). A) Controle sadio. B) Controle salina. C) Controle ração medicada. D) Infectado não-tratado. E) Tratamento AZT 100. F) Tratamento AZT 125. Seta simples: células cloreto, seta grossa: células mucosa, seta dupla: aumento do espaço interlamelar, seta com asterisco: hipertrofia do epitélio lamelar. Coloração: azul de toluidina. Barra de escala: 10µm.

**Tabela 15.** Características histológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* após ensaio de eficácia (5 d).

Estágio	LESÕES	Tratamentos					
		CS	CSAL	CRM	INTR	AZT 100	AZT 125
<b>BRÂNQUIAS</b>							
<b>I</b>	Hipertrofia do epitélio das lamelas	+	++	0	++	+	+
	Hiperplasia do epitélio do filamento	0	0	0	0	+	+
	Fusão das lamelas	0	0	0	0	0	0
	Descolamento epitelial da lamela	0	0	0	++	+	0
	Descolamento epitelial do filamento	0	0	0	0	0	0
	Proliferação de células cloreto	+	+	+	+	++	+++
	Proliferação de células mucosas	0	+	++	0	++	+++
	Congestão	0	0	0	+	0	0
	Edema	+	+	++	++	++	++
	Dilatação dos vasos sanguíneos	0	0	0	0	0	0

0 = ausente; + = pouco frequente. ++ = frequente. +++ = muito frequente

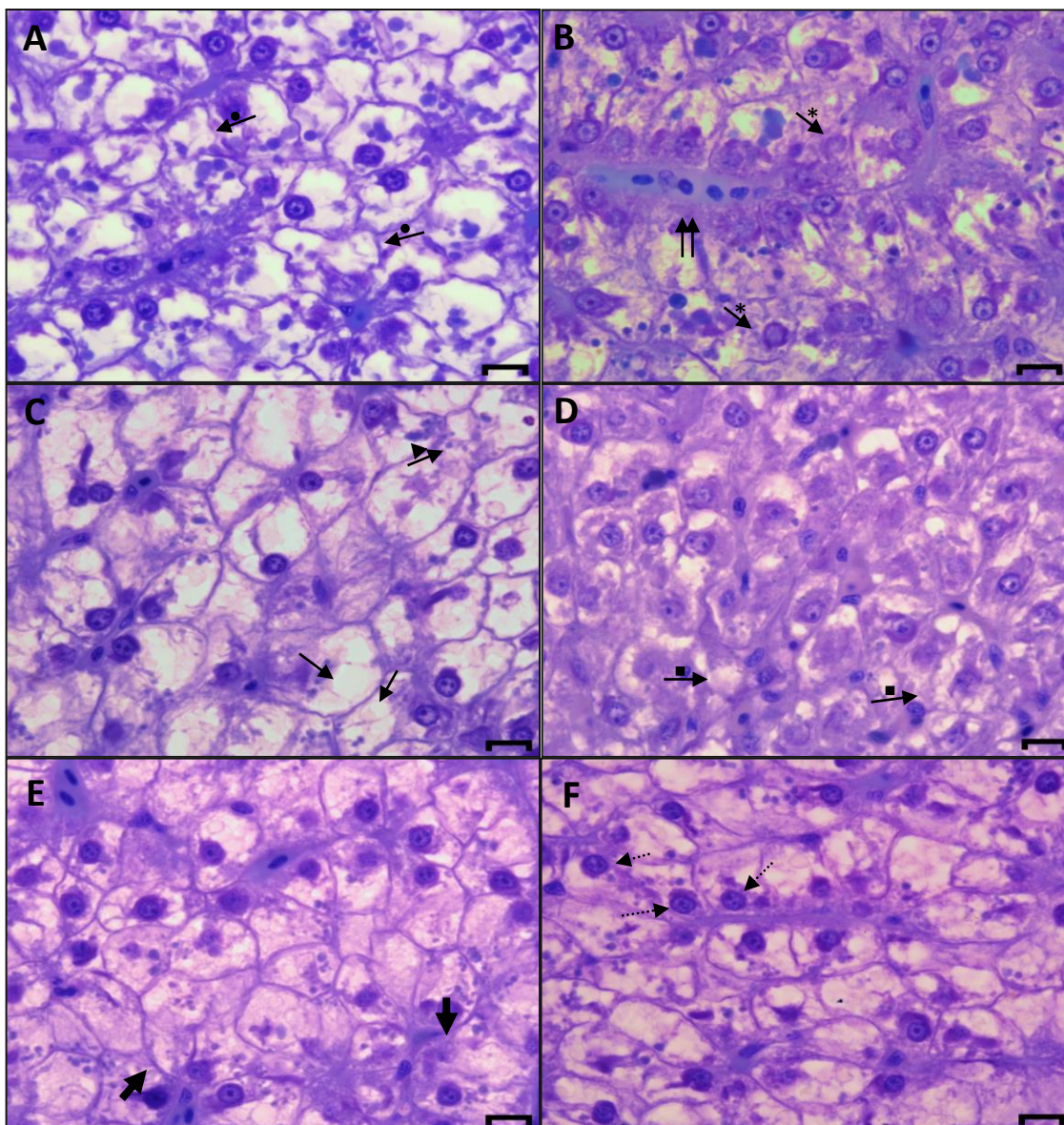
**Tabela 16.** Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias de *Oreochromis niloticus* após ensaio de eficácia (5 d).

Concentrações	IAH
	Brânquias
CS	1,9
CSAL	2,81
CRM	4,8
INTR	4,37
AZT 100	5,15
AZT 125	5,45

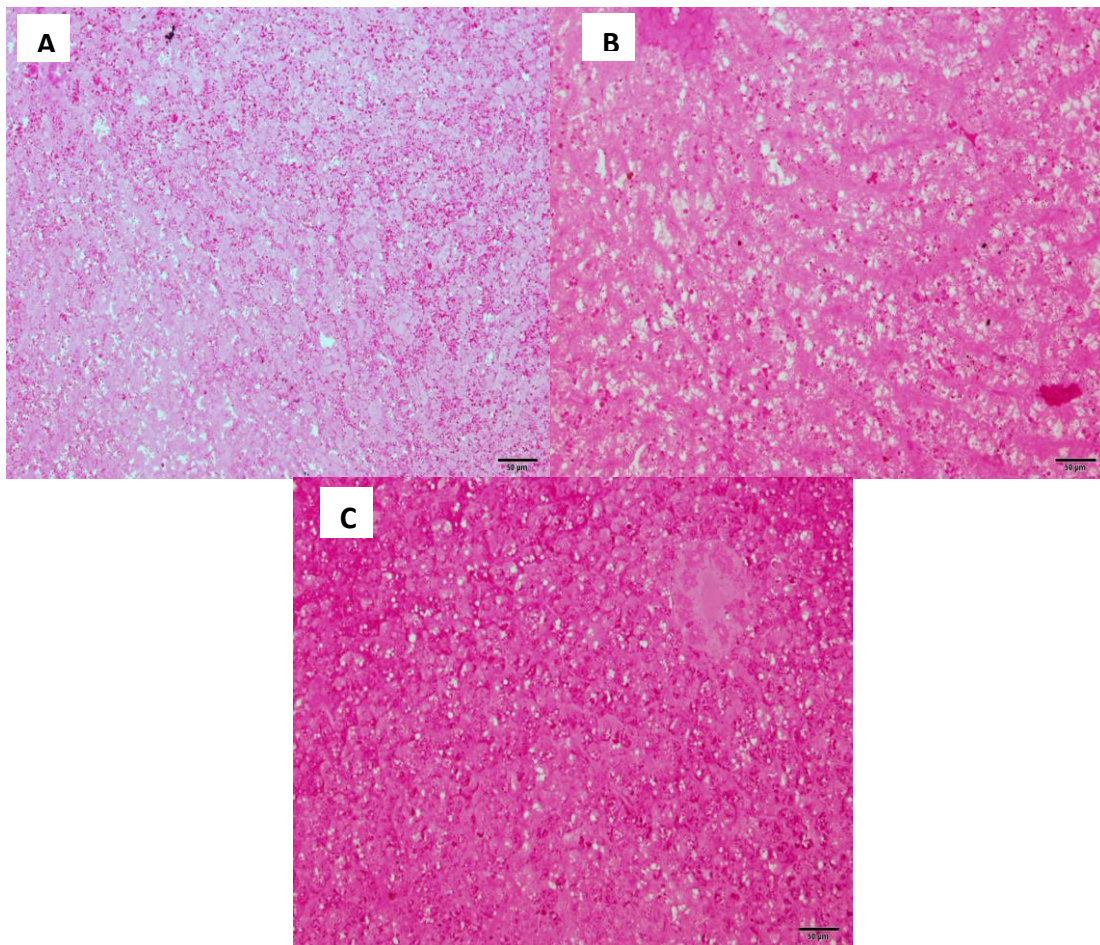
#### **4.3.4. Histologia e histoquímica do fígado**

As alterações mais frequentes no ensaio de eficácia foram hipertrofia celular, deslocamento nuclear, vacuolização citoplasmática, deformação na membrana celular, grânulos eosinófilos e degeneração citoplasmática (Figura 14A), atrofia nuclear (Figura 14B) e um aumento na frequência dos vasos sanguíneos (Figura 14C, D, E e F; Tabela 17). Na análise de PAS não ocorreu diferença nas colorações entre as diferentes concentrações testadas, pois foram encontradas lâminas de fígado pouco coradas, coradas e muito coradas em todos os tratamentos evidenciando uma grande variabilidade entre os animais quanto à reserva de glicogênio no fígado (Figura 15).

O IAH para o controle sadio, infectado não-tratado e AZT 100 indicou danos leves a moderados no órgão, sendo respectivamente 16,05; 18,3 e 11,05. Para o controle salina e controle ração medicada indicou estrutura e funcionamento normal do órgão, 10,6 e 9,85, respectivamente, e para o tratamento de AZT 125, indicou alterações moderadas a severas no órgão, sendo o IAH de 23,2 (Tabela 18).



**Figura 14.** Fotomicrografias representativas de fígado de *Oreochromis niloticus* submetidos ao ensaio de eficácia (5 d). **A)** Controle sadio. **B)** Controle salina. **C)** Controle ração medicada. **D)** Infectado não tratado. **E)** Tratamento AZT 100. **F)** Tratamento AZT 125. Seta com círculo: deformação da membrana celular, seta dupla: dilatação de sinusóides, seta com asterisco: degeneração nuclear, seta com triângulo: grânulos eosinófilos, seta simples: vacuolização citoplasmática, seta com quadrado: degeneração citoplasmática, seta grossa: hipertrofia celular, seta pontilhada: deslocamento nuclear. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala: 10µm.



**Figura 15.** Fotomicrografia de fígado de *Oreochromis niloticus* expostos à azitromicina submetidos ao ensaio de eficácia indicando colorações diferentes em resposta à reação de PAS. A) Pouco corado; B) Corado e C) Muito corado. Barra de escala: 20 $\mu$ m.

**Tabela 17.** Características histológicas de fígado de *Oreochromis niloticus* após ensaio de eficácia (5 d).

Estágio	LESÕES	Tratamentos					
		CS	CSAL	CRM	INTR	AZT 100	AZT 125
<b>I</b>	Hipertrofia celular	+	+	+	+	+	++
	Atrofia nuclear	0	0	0	0	0	+
	Aumento da frequência de vasos	0	0	+	+	+	+
	Deformação celular	0	0	+	+	++	++
	Núcleos periféricos	++	+++	++	++	+++	+++
	Vacuolização citoplasmática	+	+++	+	++	++	+++
	Grânulos eosinófilos	+	+	+	0	0	0
	Lipídeos	0	0	0	0	0	0
<b>II</b>	Vacuolização nuclear	0	0	0	0	0	0
	Degeneração nuclear	0	0	0	0	0	0
	Degeneração citoplasmática	+	+	+	++	+	++
	Ausência de núcleo	0	0	0	0	0	0
	Rompimento celular	0	0	0	0	0	0
	Congestão	0	0	0	0	0	0

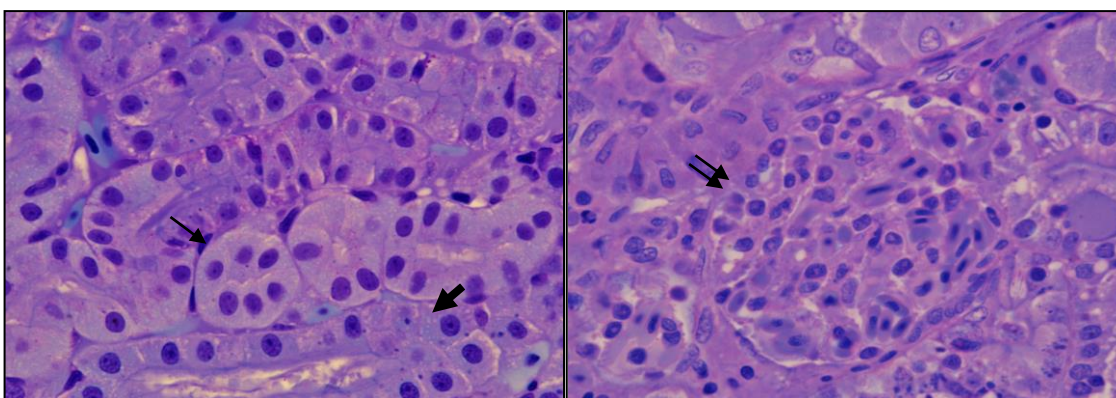
0 = ausente; + = pouco frequente. ++ = frequente. +++ = muito frequente

**Tabela 18.** Índice de alterações histopatológicas (IAH) de fígado de *Oreochromis niloticus* após ensaio de eficácia (5 d).

Concentrações	IAH
	Fígado
CS	16,05
CSAL	10,6
CRM	9,85
INTR	18,3
AZT 100	11,05
AZT 125	23,2

#### 4.3.5 Histologia do rim

Os rins avaliados das tilápias submetidas ao ensaio de eficácia não apresentaram nenhuma alteração em nenhum dos tratamentos e o IAH indicou estrutura normal dos rins sugerindo que a AZT e a infecção não interferiram no funcionamento normal deste órgão (Figura 16).



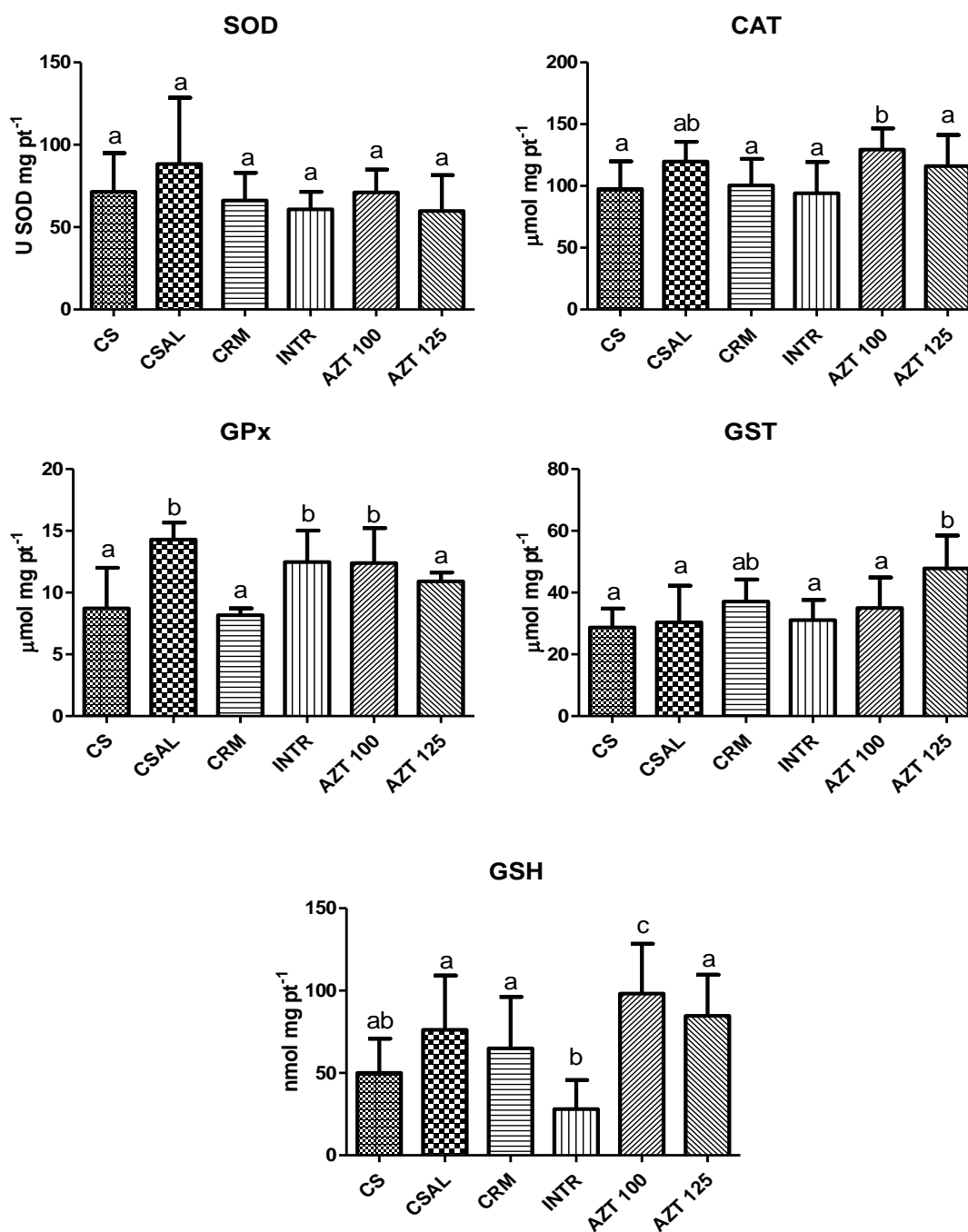
**Figura 16.** Fotomicrografias representativas de rim de *Oreochromis niloticus* submetidos ao ensaio de eficácia (5 d). As setas indicam as estruturas do rim. Seta simples: túbulo distal; Seta grossa: túbulo proximal; Seta dupla: glomérulo. Coloração: azul de toluidina e fucsina básica. Barra de escala: 10µm.



#### **4.3.6. Defesas antioxidantes no fígado**

Na figura 17 estão apresentados os resultados das análises das enzimas de defesas antioxidantes SOD, CAT e GPx, da enzima de biotransformação de fase II, a GST, e a concentração de GSH no fígado dos animais no ensaio de eficácia. A SOD não apresentou diferença entre os tratamentos, mas ocorreu aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da atividade da CAT no tratamento de AZT 100 em relação aos demais tratamentos, com exceção do controle salina. A atividade da GPx aumentou significativamente nos tratamentos controle salina, infectado não-tratado e AZT 100 em relação aos demais tratamentos.

A atividade da GST aumentou significativamente no tratamento de AZT 125 em relação aos demais tratamentos, com exceção do controle ração medicada. O nível de GSH diminuiu no tratamento infectado não-tratado em relação aos demais tratamentos, com exceção do controle sadio e ocorreu um aumento significativo no tratamento de AZT 100.

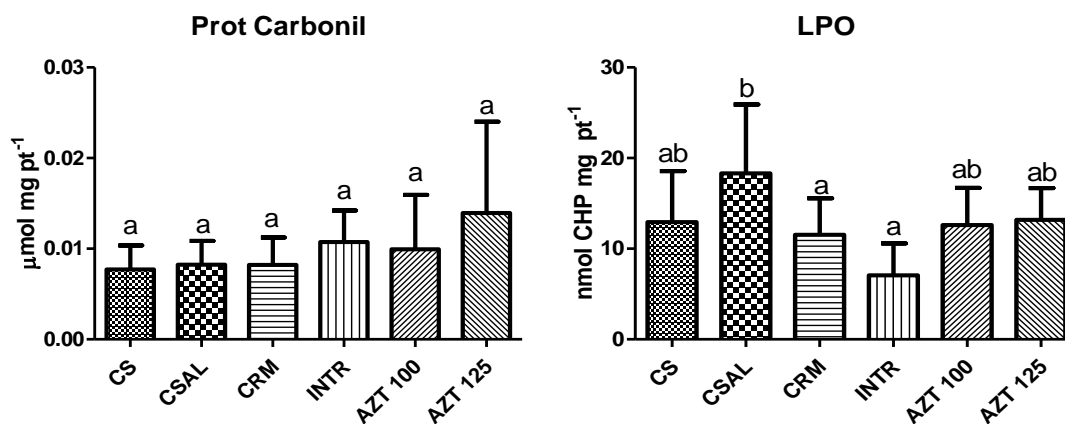


**Figura 17.** Valores médios ( $\pm$  DP) da atividade específica das enzimas (Superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutaciona peroxidase - GPx, glutaciona-S-transferase - GST) e nível de glutaciona (GSH) hepática de *Oreochromis niloticus* em ensaio de eficácia (5 d). As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.7. Danos hepáticos

Na Figura 18 estão os valores do nível de proteína carbonilada e lipoperoxidação em fígado de tilápia em ensaios de eficácia. Não ocorreu diferença significativa entre os

tratamentos no nível de proteína carbonilada, porém o nível de lipoperoxidação aumentou significativamente no controle salina em relação aos tratamentos controle ração medicada e infectado não-tratado.



**Figura 18.** Valores médios ( $\pm$  SD) da concentração de proteínas carboniladas e de hidroperóxido de cumeno no fígado de *Oreochromis niloticus* submetido à azitromicina após ensaio de eficácia (5 d). As letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Toxicidade da Azitromicina

Os resultados deste estudo indicam que o antimicrobiano AZT em concentrações até  $100 \text{ mg L}^{-1}$  no meio aquático ou administrados na ração não causa letalidade, aguda ou crônica, em *O. niloticus*. Assim, este antimicrobiano pode ser considerado como não-tóxico de acordo com a classificação de Zucker (1985). Estudos em espécies de peixes utilizando a ERT, que pertence ao grupo dos macrolídeos como a AZT, e outros antimicrobiano também não causaram toxicidade aguda, uma vez que, as CL50 são acima de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , exceto a da oxitetraciclina para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e para o mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) (Tabela 19). As espécies com concentração letal 50% (CL50) foram determinadas se mostraram tolerantes aos macrolídeos e ao flofernicol.

**Tabela 19.** Toxicidade aguda de antibióticos em diferentes espécies de peixes.

<b>Antibiótico</b>	<b>Espécie</b>	<b>CL50/DL50</b>
Azitromicina	<i>Oreochromis niloticus</i>	CL50;48h > 100 mg L <sup>-1</sup> (este estudo)
Eritromicina <sup>1</sup>	<i>Morone saxatilis</i>	CL50;96h = 349 mg L <sup>-1</sup>
Eritromicina <sup>2</sup>	<i>Salmo salar</i>	DL 50 = 1041 mg kg <sup>-1</sup>
Eritromicina <sup>2</sup>	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	DL 50 = 505 mg kg <sup>-1</sup>
Eritromicina <sup>2</sup>	<i>Oncorhynchus clarki</i>	DL 50 = 549 mg kg <sup>-1</sup>
Eritromicina <sup>2</sup>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	DL 50 = 513 mg kg <sup>-1</sup>
Eritromicina <sup>3</sup>	<i>Danio rerio</i>	CL50;96h > 1000 mg L <sup>-1</sup>
Oxitetraciclina <sup>3</sup>	<i>Danio rerio</i>	CL50;96h > 1000 mg L <sup>-1</sup>
Oxitetraciclina <sup>4</sup>	<i>Salvelinus. namaycush</i>	CL50;24h > 200 mg L <sup>-1</sup>
Oxitetraciclina <sup>5</sup>	<i>Morone saxatilis</i>	CL50;48h de 125 mg L <sup>-1</sup>
Oxitetraciclina <sup>6</sup>	<i>Oryzias latipes</i>	CL50;48h de 110,1 mg L <sup>-1</sup>
Oxitetraciclina <sup>7</sup>	<i>Oryzias latipes</i>	CL50;48h = 215,4 mg L <sup>-1</sup> CL50;96h = 110 mg L <sup>-1</sup>
Oxitetraciclina <sup>8</sup>	<i>Hyphessobrycon eques</i>	CL50;96h = 5,49 mg L <sup>-1</sup>
Oxitetraciclina <sup>9</sup>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	LC(I)50;48h = 7,6 mg L <sup>-1</sup>
Florfenicol <sup>9</sup>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	LC(I)50;48h > 1000 mg L <sup>-1</sup>
Florfenicol <sup>10</sup>	<i>O. mykiss</i>	LC(I) 50;48h > 780 mg L <sup>-1</sup>
Florfenicol <sup>10</sup>	<i>Lepomis macrochirus</i>	LC(I)50;48h > 830 mg L <sup>-1</sup>

<sup>1</sup> BILLS et al., 1993; <sup>2</sup>KIRYU e MOFFITT, 2002; <sup>3</sup> ISIDORI et al., 2005; <sup>4</sup> WEBB, 2001; <sup>5</sup> BOXALL et al., 2002; <sup>6</sup>KIM, 2007; <sup>7</sup> PARK e CHOI, 2008; <sup>8</sup>FUJIMOTO et al., 2012; <sup>9</sup>CARRASCHI et al., 2011; <sup>10</sup>SCHERING-PLOUGH, 2009.

Em geral, os antimicrobianos são produzidos para atuar em microrganismos alvo específicos, as bactérias ou outros organismos pluricelulares e apresentam toxicidade seletiva sem afetar o hospedeiro. A baixa toxicidade da AZT para *O. niloticus* favorece

o seu possível uso nesta espécie em relação a ERT pelo fato da AZT ter espectro de ação mais amplo (PETERS et al., 1992) e maior estabilidade em meio ácido uma vez que, em geral, a administração de antibióticos no controle de doenças em piscicultura se faz via oral, sendo administrado na ração.

A AZT é relativamente estável no pH do estômago; em pH 2, a ERT decai 10 % em 3,7 segundos, enquanto que, a AZT decai 10 % em 20 min (FIESE e STEFFEN, 1990). Apresenta potência melhorada contra organismos gram-negativos (RETSEMA et al., 1987) e excelente atividade in vivo contra infecções localizadas devido aos níveis altos e prolongados da AZT nos tecidos (GIRARD et al., 1987, GIRARD et al., 1990). A AZT apresenta uma longa meia vida em canídeo, felino, répteis e equídeos de 35 horas (HUNTER, 2003). A AZT em mamíferos é eliminada praticamente inalterada (SHEPARD e FALKNER, 1990; HUNTER et al., 1995).

A toxicidade é um fator fundamental para a regulação da dose (concentração) a ser utilizada no tratamento de peixes. Entretanto, a baixa toxicidade dos antibióticos às diferentes espécies não significa que não causem efeitos colaterais e/ou alteração nas funções orgânicas. Em humanos, o uso prolongado de AZT causa alterações hematológicas, hepáticas, renais e, em menor extensão, no sistema nervoso (ANVISA, 2015).

## **5.2. Variáveis Hematológicas**

As variáveis hematológicas proporcionam informações rápidas sobre a higidez dos animais e, na aquicultura, são recomendadas como rotina para o monitoramento da saúde dos estoques e efeitos colaterais em resposta a um tratamento terapêutico (OMOREGIE e OYEBANJI, 2002). A exposição crônica ao AZT e o teste de eficácia

com o antimicrobiano não evidenciaram alterações severas na hematologia e nos leucócitos de *O. niloticus*.

Em geral, alterações das variáveis hematológicas, série vermelha, podem ser interpretadas como respostas compensatórias para aumentar a capacidade de carregamento do oxigênio e manter a transferência de gás para os tecidos (Li et al., 2011b). Após exposição crônica, o aumento do Hct, concentração de Hb nos animais expostos às concentrações mais altas de AZT e do VCM nos animais expostos a 1,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> de AZT indicaram que pode ter ocorrido devido à liberação na corrente sanguínea de eritrócitos imaturos que possuem tamanho maior e/ou ao movimento de água entre o plasma e os eritrócitos com possível entrada de água nos eritrócitos (FLETCHER 1975; ABHIJITH et al. 2012).

A possibilidade de entrada de água nos eritrócitos e, conseqüente, aumento do volume é indicado pelo aumento da osmolalidade plasmática durante a exposição crônica. Estas alterações sugerem um ajuste fisiológico devido ao aumento da demanda metabólica e/ou falha na absorção de O<sub>2</sub> devido à alteração na barreira água sangue da lamela branquial e tem sido descrito em diferentes espécies expostas a agentes terapêuticos, como, por exemplo, o cloranfenicol incorporado à ração nas concentrações de 15, 30 e 45 mg Kg<sup>-1</sup> (SHALABY et al., 2006).

A presença do AZT na água pode atuar como um agente irritante e induzir a uma maior produção de muco pelas células mucosas nas brânquias. Nesse caso, as alterações no Hct, concentração de Hb e VCM poderiam proporcionar uma maior absorção de O<sub>2</sub> nas lamelas branquiais e maior capacidade de carrear O<sub>2</sub> aos tecidos (LI et al., 2011a; ABHIJITH et al., 2012, PAULINO et al., 2014). A exposição de *Labeo rohita* a oxitetraciclina, que possui uma parte do espectro de ação semelhante ao AZT, durante 25 dias, induziu aumento no Hct e na concentração de Hb concomitantemente com

aumento do batimento opercular e secreção de muco (AMBILI et al., 2013), sugerindo aumento da barreira de difusão de O<sub>2</sub> nas brânquias.

No caso de *O. niloticus* desafiados com *A. hydrophila* e tratados com AZT administrado na ração, não foram observadas, nos animais do grupo CRM, alterações na série vermelha similares aos dos grupos expostos ao AZT na água (toxicidade aguda). Redução do Hct e RBC ocorreu apenas nos animais infectados não tratados (grupo INTR) evidenciando efeito da infecção associado ao rompimento de pequenos vasos sanguíneos com consequentes regiões hemorrágicas, uma vez que, nos animais infectados, porém tratados com o AZT (AZT 100 e AZT 125) essas variáveis não foram alteradas, indicando que esse antimicrobiano, quando administrado via ração, não interfere nestes parâmetros.

A resposta a um dado fármaco parece depender da sensibilidade da espécie, forma e concentração administrada e tempo de exposição/administração. Em *O. niloticus*, a oxitetraciclina administrada na ração à concentração de até 5% da massa úmida da ração, alimentados 3 vezes ao dia a 6% da massa corpórea, durante oito semanas, causou diminuição do Hct, da concentração de Hb e do RBC diretamente proporcional a concentração de oxitetraciclina evidenciando a indução de anemia possivelmente por lise dos eritrócitos e/ou inibição da produção de eritrócitos (OMOREGIE e OYEBANJI, 2002). Em *Cyprinus carpio*, a administração de diclofenaco (anti-inflamatório) causou diminuição do RBC que também foi atribuído a possível lise dos eritrócitos ou inibição da eritropoiese (SARAVANAN et al., 2011).

Os leucócitos estão envolvidos na regulação das funções imunológicas ou mecanismo de defesa celular não específico associado aos linfócitos, monócitos/macrófagos e granulócitos sendo sua alteração, em geral, proporcional à

potência do agente tóxico ou infectante (McLEAY e GORDEN, 1977; SECOMBES, 1996; AMBILI et al., 2013).

Os monócitos e granulócitos são células fagocíticas móveis do sangue e em tecidos linfoides secundários e são importantes no processo inflamatório, pois são a resposta celular à invasão microbiana e/ou injúria ao tecido levando ao acúmulo de leucócitos e fluídos ao local (SECOMBES, 1996). Os granulócitos podem ser subdivididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos, sendo este último ausente na maioria das espécies de peixes (SECOMBES, 1996). Em *O. niloticus*, no presente estudo, o aumento dos leucócitos e ausência de alteração na percentagem dos diferentes tipos de leucócitos, após a exposição crônica a 100,0 mg AZT L<sup>-1</sup>, e de trombócitos, após exposição crônica a 50,0 e 100,0 mg AZT L<sup>-1</sup> sugere que o AZT, dependendo da concentração estimula esse sistema. Nos animais infectados não tratados (INTR), a diminuição da porcentagem de linfócitos (linfocitopenia) sem a redução do número total de leucócitos demonstrou a ocorrência de infecção, uma vez que, esse tipo celular é o primeiro a ocorrer no local de infecção. Concomitantemente, o aumento de neutrófilos (neutrofilia), que são células fagocíticas e aparecem nos locais de infecção posteriormente, nesse grupo de animais (INTR) sugere a ocorrência de liberação destas células na corrente sanguínea que, com a não alteração nos níveis de leucócitos totais e porcentagem diferencial confirmam o efeito estimulante do AZT.

Em relação aos trombócitos, que tem papel semelhante às plaquetas nos mamíferos em relação à coagulação sanguínea e que, em peixes, evidências sugerem que tenha também papel no sistema de defesa do organismo, uma vez que apresentam substâncias envolvidas na atividade fagocitária, o aumento dessas células parece ter sido estimulado nos animais expostos a 100 mg L<sup>-1</sup> de AZT na água (exposição crônica) e nos animais desafiados com *A. hydrophila* e tratados com 125 mg kg<sup>-1</sup> AZT na ração.



Outros antibióticos têm apresentado efeito contrário ao AZT. A exposição a oxitetraciclina induziu leucopenia e trombocitopenia em *O. niloticus* (OMOREGIE e OYEBANJI, 2002) e linfocitopenia em *O. mykiss* (LUNDEM et al., 1998) e em *Hyphessobrycon eques* (FUJIMOTO et al., 2012).

A alteração na distribuição de leucócitos e sua ativação são conhecidas como uma resposta a injúria e alterações na concentração de certas proteínas plasmáticas podem auxiliar na identificação, destruição e remoção do agente agressor ou tecido danificado (DEMERS e BAYNE, 1997). Como nos demais animais, os peixes possuem mecanismos não específicos e específicos humorais inatos mediados por células para resistir a doenças bacterianas como a produção de substâncias antimicrobianas de amplo espectro, proteínas de fase aguda, ativação não clássica do sistema complemento, liberação de citocinas, inflamação e fagocitose (ELLIS, 2001).

A lisozima é uma proteína plasmática que cliva as superfícies das bactérias Gram positivas e Gram negativas hidrolizando o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina constituintes da camada de peptidoglicanos das paredes celulares bacterianas e constitui um dos agentes do sistema de defesa inata (ELLIS, 1999). O sistema complemento, constituído por um conjunto de proteínas presentes no soro, é um importante mecanismo de defesa com duas vias de ativação, via alternativa e via clássica (ELLIS, 1999). A via alternativa é anticorpo independente e é muito alta em soro de peixe comparada com os mamíferos sugerindo que essa via é mais importante em peixes do que em mamíferos (YANO, 1996; ELLIS, 1999). Paralelamente, as células fagocíticas tem um importante papel nas defesas antibacterianas por engolfar e matar as bactérias pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante um processo denominado explosão respiratória (*burst* respiratório), que inclui a produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$  e o radical livre hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (SECOMBES, 1996).

A ativação de macrófagos e granulócitos pela invasão de microrganismos é a primeira linha de defesa celular contra infecção; falha em gerar essa resposta leva a uma persistente ameaça de infecção a menos que um antibiótico apropriado seja fornecido ao animal (TAN e BERRIDGE, 2000). Neste estudo, o desafio com *A. hydrophila* e a administração de AZT as tilápias não alteraram a atividade da lisozima, sistema complemento no soro e o *burst* respiratório em leucócitos não evidenciando estimulação ou inibição desse sistema. A atividade da lisozima, como os demais parâmetros, apresentou grande variabilidade entre os animais de um mesmo grupo. O aumento da atividade da lisozima é principalmente observado em 10 min e até 30 min após a injúria, ou seja, estresse agudo pode aumentar a atividade da lisozima e, segundo esses autores, o aumento da atividade da lisozima não é indicativo de uma maior resistência do peixe, mas pode refletir uma maior suscetibilidade do organismo ao agente estressor ou patógeno (FEVOLDEN et al., 1994). Após estresse crônico ou injúria, como no caso do desafio com *A. hydrophila*, poderia ser esperado, inclusive ocorrer redução da atividade. A atividade da lisozima depende do grau de estresse, intensidade e duração e tipo de agressor (YILDIZ, 2006, SAURABH e SAHOO, 2008).

O AZT não afetou o sistema imunológico inato dos peixes desafiados com *A. hydrophila* medicados e/ou tratados com AZT.

### **5.3. Alterações Morfológicas**

#### **5.3.1. Brânquias**

A estrutura branquial de tilápia, *O. niloticus*, segue o padrão básico já descrito para outros teleósteos (HUGHES, 1972; FERNANDES e RANTIN, 1986). As brânquias estão situadas nos dois lados da faringe, são constituídas por quatro arcos branquiais que possuem duas fileiras de filamentos ou lamelas primárias e acima e

abaixo de cada filamento se encontram as lamelas ou lamelas secundárias, que são a região onde ocorre as trocas de gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ) no processo de respiração. O epitélio que cobre o filamento é constituído por várias camadas de células e o epitélio lamelar é constituído por 2 camadas de células. A superfície epitelial é constituída por células pavimentosas e entre elas encontram-se células-cloreto e células mucosas. Esses dois tipos celulares, em geral, não estão presentes no epitélio lamelar, exceto em peixes que vivem em ambientes pobres em íons e com baixa dureza ou quando ocorre disfunção no equilíbrio iônico e ácido-base (FERNANDES e MAZON, 2003).

Após a exposição crônica ao AZT e desafio com *A. hydrophila*, o IAH calculado para as brânquias de *O. niloticus* indicaram estrutura e função normal. As alterações no epitélio do filamento e lamelas como descolamento do epitélio do filamento e lamela, hipertrofia de células pavimentosas constituem respostas de defesa que aumentam a distância de difusão água-sangue e dificultam a absorção do xenobiótico presente na água (MALLAT, 1985).

O descolamento do epitélio do filamento (região basal) e lamela, observado com maior intensidade nos animais desafiados com *A. hydrophila* e não tratados (grupo INTR), embora também observados nos grupos tratados com AZT ou expostos a esse composto (toxicidade crônica), evidenciam a presença de edema, com consequente aumento dos espaços intercelulares. O descolamento do epitélio pode produzir uma diminuição da superfície de troca gasosa que, juntamente com a hipertrofia do epitélio, pode resultar num aumento da barreira água-sangue e comprometer a função respiratória (SAYED et al., 2012). NUNES et al., 2015, estudando os efeitos da exposição aguda da tetraciclina em *Gambusia holbrooki*, reportaram alterações histopatológicas em brânquias tais como: descolamento epitelial, fusão de lamela, hipertrofia, aneurismas e alguns sinais de necrose e associou a aumento na barreira

água-sangue e possível redução das trocas de gases. Entretanto, no caso do presente estudo, o descolamento ocorreu, principalmente, na região basal do epitélio do filamento e não há evidencia de que tenha interferido nas trocas gasosas. A não alteração na frequência de células cloreto mostra que a AZT não interferiu na regulação iônica, entretanto a diminuição das células mucosas sugere possível diminuição da produção de muco. A presença de xenobióticos na água pode induzir a produção de muco mais viscoso e que dificulta as trocas gasosas nas lamelas (PAULINO et al., 2012, 2014).

De forma geral, as alterações nas brânquias de *O. niloticus* após exposição crônica ao AZT e desafiadas com *A. hydrophila* não foram severas e, nos tratamentos, o IAH indicou estrutura e função normal do órgão. *Oreochromis niloticus* tem extensa área de superfície branquial, alta frequência de lamelas (FERNANDES e RANTIN, 1986), alta extração de O<sub>2</sub> do meio aquático e custo metabólico da ventilação branquial relativamente baixo (FERNANDES e RANTIN, 1994), de forma que ajustes fisiológicos como os relacionados às variáveis hematológicas podem suprir as necessidades metabólicas em períodos que as respostas morfológicas de defesa dificultam as trocas gasosas.

### **5.3.2. Fígado**

O fígado da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) é um órgão grande dividido em dois lobos. O lobo esquerdo é maior e se espalha por quase toda a cavidade corporal. O parênquima hepático é constituído por hepatócitos arranjados em duas camadas celulares formando cordões anastomóticos cercados por sinusóides; os hepatócitos apresentam um núcleo redondo, usualmente localizado centralmente, com nucléolo (VICENTINI et al., 2005). Além de ser um importante órgão de armazenamento de

substâncias, a função primária deste órgão em peixe é desintoxicação (OLSSON et al., 1996).

Após exposição crônica a AZT, o fígado de *O. niloticus* apresentou lesões leves a severas distribuídas por todo o órgão com o IAH variando de 19,95 no controle a 57,45 nos demais grupos após a exposição crônica; nos animais desafiados com *A. hydrophila* o IAH variou de 10,6-16,05 no grupo controle e salina, respectivamente, a 18,3 a 23,2 nos animais desafiados com *A. hydrophila* e não tratados (INTR) e o tratado com AZT na ração (AZT125). Dentre as alterações histopatológicas, a hipertrofia celular, deslocamento nuclear e vacuolização citoplasmática foram as mais frequentes. Essas alterações são sinais de processos degenerativos que podem envolver danos metabólicos (PACHECO e SANTOS, 2002, CAMARGO e MARTINEZ, 2007). O aumento da frequência de vasos que ocorreu nos animais dos grupos expostos ao AZT no ensaio crônico e nos grupos CRM, INTR, AZT100 e AZT125 dos animais desafiados com *A. hydrophila* caracterizam alteração em resposta a xenobióticos (poluentes ou fármacos) com aumento da perfusão do fígado.

Alguns antibióticos causam respostas mais severas; a exposição à tetraciclina causou dilatação dos sinusóides, sinais de hemorragia, processos inflamatórios e vacuolização generalizada no fígado de *Gambusia holbrooki* (NUNES et al., 2015). Trutas arco-íris (*O. mykiss*) nas quais o antibiótico fumagilin foi administrado oralmente nas doses de 30 e 60 mg kg<sup>-1</sup>, causou necrose hepática focal (LAURÉN et al., 1989), o que não foi observado no presente estudo.

Hepatócitos armazenam grânulos de glicogênio no citoplasma que podem ser visualizados pela técnica do PAS e são reservas energéticas para o organismo. Não ocorreu diferença nas colorações entre as diferentes concentrações de AZT testadas no ensaio crônico e nem nos animais desafiados com *A. hydrophila* devido à grande

variabilidade entre os animais quanto à reserva de glicogênio no fígado. Assim, não foi possível estabelecer possível evidência de mobilização de reservas energéticas entre os grupos.

### 5.3.3. Rins

O rim posterior de peixes é constituído por muitos néfrons e tecido linfóide intersticial. Os néfrons de rins de teleósteos são divididos em corpúsculo renal (glomérulos e cápsula de Bowman), túbulo renal e segmentos proximal e distal (ALVES e PINHO, 1984). O rim de *O. niloticus* caracteriza-se por apresentar vários glomérulos juntos e outros isolados, o túbulo proximal tem epitélio com células cúbicas ciliadas e núcleos mais centrais enquanto que o túbulo distal tem células cúbicas ciliadas com núcleos mais basais. A exposição ou a administração de AZT não alterou a estrutura e organização celular dos rins de *O. niloticus*.

Entretanto, outros antibióticos causam alterações nos rins de peixes. Em *Oncorhynchus tshawytscha*, injeção de eritromicina (Erythro-200) causou vacuolização citoplasmática, associada com aumento de volume celular, degeneração hialina e necrose nos túbulos proximais renais (KIRYU e MOFFITT, 2001). Em *Cyprinus carpio*, após administração de 150,0 mg kg<sup>-1</sup> de oxitetraciclina, ocorreu necrose em tecidos hematopoiéticos no rim anterior (SVOBODOVÁ, 2006). Em Tinca tinca, a oxitetraciclina casou necrose do epitélio tubular e do tecido hematopoiético renal após a administração intramuscular por sete dias (SOLER et al., 1996) e, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o antibiótico fumagillin administrado oralmente nas doses de 30 e 60 mg kg<sup>-1</sup> causou alterações nas células tubulares, vacuolização e desprendimento da membrana basal no rim posterior (LAURÉN et al., 1989). Entretanto, em *Piaractus mesopotamicus*, diferentes concentrações de oxitetraciclina não causaram alterações no

tecido renal (CARRASCHI et al., 2012). Estes dados sugerem que, embora o antibiótico seja excretado pelos rins, a toxicidade dos fármacos varia de acordo com a sensibilidade da espécie estudada.

#### **5.4. Respostas antioxidantes e estresse oxidativo no fígado**

O metabolismo aeróbico produz espécies reativas de oxigênio (EROs) que são neutralizadas pelas substâncias do organismo que constituem as defesas antioxidantes enzimáticas ou não enzimáticas. As defesas antioxidantes das quais a SOD, CAT e GPx constituem a primeira linha são encontradas em maior abundância no fígado, uma vez que ele é o principal órgão de desintoxicação de xenobióticos no organismo e processamento de produtos metabólicos para excreção (LUSHCHAK et al., 2005).

A exposição crônica a AZT não induziu alterações nas defesas antioxidantes indicando nas concentrações a que *O. niloticus* foi exposta, os processos que envolveram a absorção, distribuição no organismo e excreção do fármaco, via bile, não produziram ERO em concentração que induzisse respostas dessas enzimas. Outros estudos, entretanto, reportaram a indução da atividade da SOD no fígado de *Carassius auratus* após exposição ao roxithromicina, um macrídeo (20 dias) (LIU et al., 2014), a eritromicina, outro macrídeo, (28 dias) (LIU et al., 2014) e a sulfamethoxazole, um antibiótico sintético (LI et al., 2012); de *O. mykiss* exposta a carbamazepine, um anticonvulsivo (LI et al., 2011a) em concentrações mais baixas do que as utilizadas nos ensaios com o AZT no presente estudo. Por outro lado, *O. niloticus* exposta via banho e via administração na alimentação aos antibióticos enrofloxacina e ciprofloxacina não apresentaram alteração da atividade da CAT (ANDRIEU et al. 2015).

O aumento da atividade GST nos animais do grupo controle positivo (etanol 0,01%) poderia estar relacionado ao metabolismo e excreção do etanol. A GST é uma

família importante de enzimas agindo na fase II do processo de detoxificação, conjugando xenobióticos com a glutatona para facilitar sua excreção (OLIVEIRA, 2013). Entretanto, nas exposições as diferentes concentrações de AZT, as quais também recebem o etanol como diluente, não foi observada a mesma alteração, o que sugere que a presença do AZT poderia interferir na disponibilidade do etanol. Considerando que, não ocorreram danos no tecido hepático analisados pelo nível de proteínas carboniladas e peróxido de lipídeos, pode-se inferir que não ocorreu estresse oxidativo nos animais expostos a AZT. As alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais expostos ao AZT podem estar associadas ao aumento da atividade metabólica hepática (hipertrofia celular, aumento da perfusão sanguínea) e a ação direta do etanol e antibiótico nos hepatócitos.

Nos animais submetidos ao ensaio de eficácia neste estudo, o aumento da CAT e GPx nos grupos CS pode ser devido a um processo de inflamação e estresse nesse grupo e indica que ocorreu um aumento de  $H_2O_2$ , entretanto o aumento da atividade dessas enzimas não foi suficiente para diminuir o estresse causado, visto que houve um aumento na LPO. O aumento da atividade da CAT, GPx e do nível da GSH observado no tratamento AZT100 também indica alta concentração de  $H_2O_2$  no fígado desses organismos, porém o não aumento do LPO e proteínas carboniladas sugere que nesses grupos a ação das enzimas foram eficientes para prevenir o estresse oxidativo. A atividade da SOD-CAT está, em geral, correlacionada. Entretanto o não aumento da SOD pode estar relacionado à baixa concentração de  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$  que estimulou a atividade da CAT pode ter tido origem em outro processo metabólico. De acordo com MATOZZO et al (2012), a SOD é inibida quando o nível de ROS é baixo e ativada em altas concentrações. A GPx, em geral, é ativada em concentrações baixas de  $H_2O_2$  e responde a outros peróxidos (PANDEY et al., 2003). No tratamento infectado não-



tratado (INTR), o aumento na atividade da GPx e a diminuição na quantidade de GSH indica a utilização desta via de detoxificação da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nestes grupo de animais. No tratamento AZT125, o aumento da CAT sugere a produção de alta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também por outros processos que não via SOD e o aumento da GST e GSH possivelmente está relacionado à conjugação do antimicrobiano para excreção. GSH é essencial para o sistema de defesa como substrato para a atividade da GPx e GST.

Uma vez que os antibióticos são especificamente designados para controlar microrganismos, eles não são altamente tóxicos para peixes (efeitos letais podem ocorrer apenas em doses extremamente altas) (HALLING-SORENSEN et al., 2000; PARK e CHOI, 2008). Entretanto, os possíveis efeitos colaterais podem ocorrer modificando a saúde do peixe e/ou sua capacidade de responder às mudanças do ambiente. A quimioterapia antibacteriana tem sido aplicada na aquicultura por mais de 60 anos. A descoberta de antibacterianos mudou o tratamento de doenças infecciosas, levando a uma drástica redução na morbidade e mortalidade, e contribuindo para um significativo avanço na saúde da população em geral (SEKKING e KUM, 2011).

Antibacterianos são comumente usados tanto profilaticamente como terapêuticamente, quando um surto da doença ocorre no sistema. Infelizmente, nem sempre os antibacterianos, têm sido usados de uma maneira responsável e, em consequência disso, o quimioterápico pode desencadear resistência microbiana ocasionando problemas de saúde pública e ambiental (SEKKING e KUM, 2011).

Por essa razão, seria indicado o uso da azitromicina de maneira responsável, uma vez que esse antibiótico não apresentou praticamente nenhuma toxicidade e foi eficaz contra a infecção por *Aeromonas* sp.

## 6. CONCLUSÕES

A AZT não é tóxica para *O. niloticus* e, em ensaio crônico, a AZT não causou alteração severas nas variáveis sanguíneas, nas estruturas das brânquias e rins, e causou alterações moderadas a severas no fígado. A exposição ao antibiótico fornece evidências de estimulação das células de defesa e não causa estresse oxidativo.

No ensaio de eficácia, a AZT mostrou eficácia no tratamento da infecção causada por *A. hydrophila* e não interferiu na atividade imune inata. Os valores de IAH das brânquias, fígado e rins, indicam que as lesões observadas não comprometem o funcionamento dos órgãos. A infecção e tratamento com AZT administrado na ração ocasionou alteração nas enzimas antioxidantes, de biotransformação de fase II, e níveis de glutathione, mas não resultou em estresse oxidativo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHIJITH, B.D., RAMESH, M., POOPAL, R.K. Sublethal toxicological evaluation of methyl parathion on some haematological and biochemical parameters in an Indian major carp *Catla catla*. *Comp. Clin. Pathol.* v. 21, p. 55-61, 2012.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15088. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes, 19p (Revisado), 2011.
- ALVES, M.I.M., PINHO, A.J.F. Histologia da pele, brânquias e rim na interpretação da regulação iônica de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *Ciên. Agron. Fortaleza.* v. 15, p.143-149,1984.
- AHMAD, I. HAMID, T. FATIMA, M. CHAND, H.S. JAIN, S.K. ATHAR M. AND RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure, *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1523, pp. 37–48, 2000.
- AMBILI, T.R., SARAVANAN, M., RAMESH, M., ABHIJITH, D.B., POOPAL., R.K. Toxicological Effects of the Antibiotic Oxytetracycline to an Indian Major Carp *Labeo rohita*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v.64, p. 494–503, 2013.
- ANDERSEN, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature reviews Neuroscience.* p. 18-25, 2004.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M.; Arthur, J.R.; Subasinghe, R.P. (Ed.) *Diseases in Asian Aquaculture II*. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202, 1994.
- ANDRIEU, M., RICO, A., PHU, T. M., HUONG, D. T. T., PHUONG, N. T., VAN DEN BRINK, P.J. Ecological risk assessment of the antibiotic enrofloxacin applied to *Pangasius* catfish farms in the Mekong Delta, Vietnam. *Chemosphere.* v.119, p. 407–414, 2015.
- ANVISA, Antimicrobianos. Bases teóricas e uso clínico.  
[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/macrolideos4.html](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/macrolideos4.html), 2014.
- ANVISA, 2015 -  
[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=10656962013&pIdAnexo=1907185](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=10656962013&pIdAnexo=1907185). Acesso em 2015.
- ARAUJO, F. G., R. M. SHEPARD, AND J. S. REMINGTON. In vivo activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v.10, p.519–523, 1991.
- ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.57, p.1825–1835, 2000.
- BANERJIE, S., HOMECHAUDHRI, S., Hematological monitoring of a bioindicator fish, *Heteropneustes fossilis*, on exposure to copper toxicity. *Israel J. Aquacult. Bamiggeh*, v. 46-51,1990.
- BAHAL, N., NAHATA, M.C. The new macrolide antibiotics: azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, and roxithromycin. *Ann. Pharmacother.* v.26, p.46–55, 1992.

- BEUTLER, E. Red cell Metabolism: a manual of biochemical methods. Grune e Straton, New York, 1975.
- 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*. Braz. J. Biol. v.73 (2), p. 425-429, 2013.
- BILLS, T.D., MARKING, L.L., HOWE, G.E. Sensitivity of juvenile striped bass to chemical used in aquaculture. United States department of the interior fish and wildlife service, Resource publication. v. 192, p.12, 1993.
- BIRKBECK, T.H., FEIST, S.W., VERNER-JEFFREYS, D.W. *Francisella* infections in fish and shellfish. J. Fish Dis. p. 34, p.173-187, 2011.
- BONNET, M. & VAN DER AUWERA, P. In vitro and in vivo intraleukocytic accumulation of azithromycin (CP-62,993) and its influence on ex vivo leukocyte chemiluminescence. Antimicrobial Agents Chemotherapy v.36, p.1302-9, 1992.
- BOSCOLO, W.R. HAYASHI, C. SOARES, C. M., FURUYA, W. M., MEURER, F. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. Rev. bras. zootec., v. 30(5), p.1391-1396, 2001.
- BOXALL, A. B. A.; FOGG, L.; BLACKWELL, P. A.; KAY, P. PEMBERTON, E., Review of Veterinary Medicines in the Environment. Environ. Ag. R&D Tech. Rep., P6-002/TR. 2002.
- BRADFORD, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. v. 72, p.218-251, 1976.
- BRIGHT, G. M., NAGEL, A. A., BORDNER, J., DESAI, K. A., DIBRINO, J. N., NOWAKOWSKA, J. et al. Azithromycin: key features. Synthesis, in vitro and in vivo activity of novel 9-deoxo-9a-AZA-9a-homoery- thromycin A derivatives: a new class of macrolide antibiotics, the azalides. J. Antibiotics v.41, p.1029-47, 1988.
- BURRIDGE, L., WEIS, J.S. CABELLO, F., PIZARRO, J., BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture. v. 306, p. 7-23, 2010
- CAMARGO, M. M. P., MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. Neotrop. Ichthyol. v.5 (3), p. 327-336, 2007
- CARRASCHI, S. P., SHIOGIRI, N. S., VENTURINI, F. P., CRUZ, C., GÍRIO, A. C. F., MACHADO NETO, J. G. Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline and florfenicol antibiotics to pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v. 37(2), p. 115 - 122, 2011
- CARRASCHI, S.P., CRUZ,C., MACHADO NETO, J.G., IGNACIO,N.F., BARBUIO, R., MACHADO, M.R.F. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. Ecotox. Environ. Safety. v.83, p.115-120, 2012.
- CARLIER, M. B., SCORNEAUX, B. & TULKENS, P. M. (1991). Accumulation, subcellular distribution and activity of azithromycin (Az) compared to roxithromycin

- (Rx) and ciprofloxacin (Cp) in J774 macrophages (M). In Program and Abstracts of the Thirty-First Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, 1991. Abstract 510, p. 184. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- CERQUEIRA, C.C.C., FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v. 52, p. 83-91, 2002.
- CIPRIANO, R.C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Disease Leaflet*, U.S. Fish and Wildlife Service. v. 68, 25p, 2001.
- CORTELLA, L.R.X.C. (2010) Estresse oxidativo em matrinxã, (*Brycon amazonicus*, Spix & Agassiz, 1829, Characidae) exposto ao inseticida piretroide Keshet®. São Carlos. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, 98p.
- COSTA, M. M., PEIXOTO, R.M., BOIJINK, C.L., CASTAGNA, L., MEURER, F., VARGAS, A.C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesq. Vet. Bras.* v.28(10), p.477-480, 2008.
- DEFOIRDT, T., BOON, N., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnol.* v.25 n.10, 2007.
- DEMERS, N.E., BAYNE, C.J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* v. 21, p. 363–373, 1997.
- DICIONARIO DE ESPECIALIDADE FARMACEUTICA – DEF, 2006.
- DI GIULIO, R.T.; MEYER, J.N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: DI GIULIO, R.T., HINTON, D.E. (Ed.) *The toxicology of fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 273-326. 2008.
- DORTS, J., SILVESTRE, F., TU, H. T., TYBERGHEIN, A., PHUONG, N. T., KESTEMONT, P. Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* v. 28, p. 302–310, 2009.
- DUARTE, C.M., MARBÁ, N., HOLMER, M. Rapid domestication of marine species. *Science*. p. 382–383, v.316, 2007.
- ELLIS, A.E. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* v. 9, p.291–308, 1999.
- ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* v. 25, p. 827-839, 2001.
- EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture*. v.179, p.149–168, 1999.
- FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, 197p, 2010.
- FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, 209p, 2012.
- FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, 223p, 2014.
- FAIRGRIEVE, W.T., MASADA, C. L., MCAULEY , W.C., PETERSON, M.E. MYERS, M.S., STROM, M.S. Accumulation and clearance of orally administered erythromycin and its derivative, azithromycin, in juvenile fall Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Organ.* v. 64, p.99–106, 2005.

- FERNANDES, M.N, MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. Fish adaptation. Science Publishers, Enfield, p. 203-231, 2003.
- FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T. Lethal temperatures of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). Rev. Brasil. Biol. v.46 (3), p. 589-595, 1986.
- FERNANDES, M. N., RANTIN, F. T. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): aquacultural consequences. Aquaculture. v.127, p. 339-346, 1994.
- FERRIANI, V.L., BARBOSA, J.E., CARVALHO, I.F. Serum hemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy: age-related changes. Acta Paediatr Scand. v. 79, p. 322-27, 1990.
- FEVOLDEN et al., 1994 Fevolden, S. E.; Reed, K. H.; Gjerde, B. Genetic components of post-stress cortisol and lysozyme activity in Atlantic salmon; correlations to disease and resistance. Fish Shellfish Immunol. p.4507-519; 1994.
- FIGESE, E.F, STEFFEN, S.H. Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin. J. Antimicrob. Chemoth. p.25, Supplement A: 39-47, 1990.
- FLETCHER, G.L. The effects of capture “stress” and storage of whole blood on the red blood cells, plasma proteins, glucose and electrolytes of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. Can. J. Zool. v. 53, p. 197–206, 1975.
- FUJIMOTO, R. Y., GABBAY, M. I., ANJOS, E. C. S., CARRASCHI, S. P., CRUZ. C. Toxicidade e risco ambiental da oxitetraciclina e efeito em leucócitos de mató grosso (*Hypessobrycon eques*). J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 7, n. 2, p. 11-15, 2012.
- GLADUE, R. P., BRIGHT, G. M., ISAACSON, R. I., NEWBORG, M. F. In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. Antimicrob. Agents Chemoth. v.33, p.277-82, 1989.
- GLADUE, R. P., SNIDER, M. E. Intracellular accumulation of azithromycin by cultured human fibroblasts. Antimicrob. Agents Chemoth v.34, p.1056-60, 1990.
- GIRARD, A. E., GIRARD, D., ENGLISH, A. R., GOOTZ, T. D., CIMOCHOWSKI, C. R., FAIELLA, J. A., HASKELL, S. L., RETSEMA, J. A. Pharmacokinetic and In Vivo Studies with Azithromycin (CP-62,993), a New Macrolide with an Extended Half-Life and Excellent Tissue Distribution. Antimicrob. Agents Chemoth. v. 31, n. 12, p. 1948-1954, 1987.
- GIRARD, A. E., GIRARD, D., RETSEMA, J.A. Correlation of the extravascular pharmacokinetics of azithromycin with in-vivo efficacy in models of localized infection. J. Antimicrob. Chemother. v.25 (suppl A), 61-71, 1990.
- HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. Methods Enzymol. v.77, p. 398–405, 1981.
- HALLING-SØRENSEN, B., LÜTZHØFT, H-C.H., ANDERSEN, H.R., INGERSLEV, F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. J. Antimicrob. Chemoth. v. 46, p. 53-58, 2000.
- HAMILTON, M.A. RUSSO, R.C. THURSTON, V. Trimed Sperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. Environ. Scien. Technol., v. 7, p.714-719, 1977.

- HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R.P., HAYASHI, C., FURUYA, W.M. (Eds.) Curso de piscicultura-Criação racional de tilápias. p.4. 1995.
- HAYES, J. D., FLANAGAN, J. U., JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. v. 45, p.51–88, 2005.
- HEATH, A.G. Water Pollution and Fish Physiology, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton, 1995.
- HRUBE, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5<sup>a</sup> ed., p.1120-1125, 1998.
- HUGHES, G.M. Morphometrics of gills. Respir. Physiol. v.14, p. 1- 25, 1972.
- HUNTER, R.P., LYNCH, M.J., ERICSON, J.F., MILLAS, W.J., FLETCHER, A.M., RYAN, N.I., OLSON, J.A. Pharmacokinetics, oral bioavailability and tissue distribution of azithromycin in cats. J. Vet. Pharmacol. Therap. v.18, p. 38–46, 1995.
- HUNTER, R. P., KOCH, D. E., COKE, R. L., GOATLEY, M. A., ISAZA, R. Azithromycin metabolite identification in plasma, bile, and tissues of the ball python (*Python regius*). J. vet. Pharmacol. Therap. v.26, p. 117–121, 2003.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Produção da Pecuária Municipal, 2013. Rio de Janeiro, Brasil. 41, 1-108.
- INGRAM, G.A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection. A review. J. Fish Biol. v.16, p.23-60, 1980.
- ISIDORI, M., LAVORGNA, M., NARDELLI, A., PASCARELLA, L., PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Science of the Total Environment. v.346, p. 87–98, 2005.
- JARURATANASIRIKUL, S., HORTIWAKUL, R., TANTISARASART, T., PHUENPATHOM, N., TUSSANASUNTHORNWONG, S. Distribution of Azithromycin into Brain Tissue, Cerebrospinal Fluid, and Aqueous Humor of the Eye. Antimicrob. Agents Chemoth. p. 825–826, v. 40, n. 3, 1996.
- JIANG, Z.Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe 2+ in the presence of xylenol orange – Comparison with TBA assay and on iodometric method. Lipids, v. 26, p. 853-856, 1992.
- KIBENGE, F.S.B., GODOY, M.G., FAST, M., WORKENHE, S., KIBENGE, M.J.T. Countermeasures against viral diseases of farmed fish. Antivir. Res. p. 257-281, v.95, 2012.
- KIM, Y., CHOI, K., JUNG, J., PARK, S., KIM, P., PARK, J. Aquatic toxicity of cetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. Environ. Int. UK. v. 33, P. 370-375, 2007.
- KIRKAN S., GOSKSOY E.O., KAYA O. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. J. Vet. Med. B. v.50, p.339-342, 2003.
- KIRYU, Y., MOFFITT, C.M. Acute LD50 and kidney histopathology following injection of erythromycin (Erythro-200) and its carrier in spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). J. Fish Dis. v. 24, p. 409-416, 2001.

- KIRYU, Y., MOFFITT, C.M. Models of comparative acute toxicity of injectable erythromycin in four salmonid species. *Aquaculture*. v. 211, p. 29–41, 2002.
- KLEIN, J. *Immunology*. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. p.311-334, 1990.
- KRUGER, N.J The Bradford method of protein quantification. *Meth. Mol. Biol.*, v. 32, p. 9-15, 1994.
- LACKNER, R. “Oxidative stress” in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (Eds), *Fish Ecotoxicology*. Basel: Birkhäuser Verlag. p. 203-224, 1998.
- LAURÉN, D.J., WISHKOVSKY, A., GROFF, J.M., HEDRICK, R.P., HINTON, D.E. Toxicity and Pharmacokinetics of the Antibiotic Fumagillin in Yearling Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharma*. v. 98, p. 444-453, 1989.
- LEITCH, J.M., YICK, P.J., CULOTTA, V.C. The right to choose: multiple pathways for activating copper, zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem*. v. 284 (37), p. 24679-83, 2009.
- LEVINE, R. L., WILLIAMS, J. A., STADTMAN, E. R., SHACTER, E. Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins *Methods in enzymology*. v. 233, p.346 -357, 1994.
- LI Z.H, ZLABEK V, VELISEK J, GRABIC R, MACHOVA J, KOLAROVA J, Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicol Environ Saf*. v. 74, p. 319–27, 2011a.
- LI, Z.H., VELISEK, J., ZLABEK, V., GRABIC, R., MACHOVA, J., KOLAROVA, J. Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses. *J. Hazard Mater*. v. 185, p. 870–880, 2011b.
- LI, Z., LU, G., YANG, X., WANG, C. Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. *Ecotoxicology*. v. 21, p. 353–61, 2012.
- LIU, J., LU, G., WANG, Y., YAN, Z., YANG, X., DING, J., Bioconcentration, metabolism, and biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to roxithromycin. *Chemosphere*. v. 99, p. 102–8, 2014.
- LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol*. v. 120A, p. 43-49, 1998.
- LODE, H. The pharmacokinetics of azithromycin and their clinical significance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. v.10, p.807–812, 1991.
- LUNDEM, T., MIETTINEN, S., LÖNNSTRÖM, L. G., LILIUS, E. M., BYLUND, G. Influence of oxytetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shell. Immunol*. v.8, p. 217–230, 1998.
- LUSHCHAK, V.I., BAGNYUKOVA, T.V., HUSAK, V.V., LUZHNA, L.I., LUSHCHAK, O.V., STOREY, K.B. Hyperoxia results in transient oxidative stress and



- an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* v. 37, p.1670–80, 2005.
- MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* v. 42, p. 630- 648, 1985.
- MATOZZO, V., FORMENTI, A., DONADELLO, G., MARIN, M.G. A multi-marker approach to assess effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Mar. Environ. Res.* v. 74, p. 40–46. 2012.
- MCCORD, J.M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem.* v. 244, p. 6049-6055, 1969.
- MCDONAGH, B., TYTHER, R., SHEEHAN, D. Redox proteomics in the mussel, *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* v.62, p. 101–104, 2006.
- MCLEAY e GORDEN, McLeay, D.J., Gorden, M.R. Leucocrit: a simple haematological technique for measuring acute stress in salmonella fish, including stressful concentrations of pulp mill effluents. *J. Fish Res. Board Can.* v.34, p.2164–2175, 1977.
- MIGLIORE L, CIVITAREALE C, BRAMBILLA G, DELUPIS GDD. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Water Res.* v. 31, p.1801– 6, 1997.
- MORAES, F.R; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleosteos em piscicultura intensiva, In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M. et al. (Eds). *Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva*. São Paulo: TecArt. pp. 343-383. 2004.
- NAGASAKA, R., OKAMOTO, N., USHIO, H. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells. *Comp. Biochem. Phys. Part C.* v.139, p. 259–266, 2004.
- NEWMAN, S.G. Bacterial vaccines for fish. *Annual Rev. of Fish Diseases.* p. 145-185, 1993.
- NUNES, B., ANTUNES, S. C., GOMES, R., CAMPOS, J. C., BRAGA, M. R., RAMOS, A. S., CORREIA, A. T. Acute Effects of Tetracycline Exposure in the Freshwater Fish *Gambusia holbrooki*: Antioxidant Effects, Neurotoxicity and Histological Alterations. *Arch Environ Contam Toxicol.* v. 68, p. 371–381, 2015.
- NYSTROM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal.* v. 24, p. 1311-1317, 2005.
- OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Draft Guidance Document, The Threshold (I) Approach for Acute Fish Toxicity Testing, Paris. pp. 4, 2009.
- OLIVEIRA, R., MCDONOUGH, S., LADEWIG, J.C.L., SOARES, A.M.V.M., NOGUEIRA, A.J.A., DOMINGUES, I. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* v.36 (3), p. 903–912, 2013.
- OLSSON, P., LARSSON, A., HAUX, C. Influence of seasonal changes in water temperature on cadmium inducibility of hepatic and renal metallothionein in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* v. 42, p. 41-44, 1996.

- OMOREGIE , E. ESEYIN, T.G. OFOJEKWU, P.C. Chronic effects of formalin on erythrocyte counts and plasma glucose of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Asian Fish. Sci., v. 7, p. 1-6, 1994.
- OMOREGIE, E. OYEBANJI, S. M. Oxytetracycline-Induced blood disorder in juvenile Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). J. World Aquacult. Soc. v. 3, p. 33. 2002.
- PACHECO, M., SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicol Environ Saf. v. 53, p.331–347, 2002.
- PANDEY, S., PARVEZ, S., SAYEED, I., HAQUE, R., BIN-HAFEEZ, B., RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study on river Yamuna fish Wallago attu. Sci. Total Environ. v.309, p. 105–115, 2003.
- PAULINO, M. G., SOUZA, N. E. S., FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. Ecotox. Environ. Safe. v.80, p.6-13, 2012.
- PAULINO, M.G., BENZE, T.P., SADAUSKAS-HENRIQUE, H., SAKURAGUI, M.M., FERNANDES, J.B., FERNANDES, M.N. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir: bioaccumulation and histopathological biomarkers. Sci. Total Environ. 497-498, 293-306, 2014.
- PARK, S., CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. Ecotoxicology, v. 17, p. 526–538, 2008.
- PETERS, D. H., H. A. FRIEDEL, AND D. MCTAVISH. Azithromycin: a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. Drugs v.44, p.750–799, 1992.
- PETERS, D.H., CLISSOLD, S.P. Clarithromycin. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetics properties and therapeutic potential. Drugs. v.44, p.117 – 64, 1992.
- POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish (R. MuKller and R. Lloyd, Eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. pp. 339-352, 1994.
- POLHILL, R.B., NEWMAN, S.L., PRUITT, K.M., JOHNSTON, R.B. Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. II. Influence of antibody on alternative pathway activation. J. Immunol. v. 121, p. 371–376., 1978.
- POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyer and Van Niel. In: DRIEG, N. R. (Ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Willians and Wilkins, v. 1, p. 545-584, 1984.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarina-lagunar de Cananéia – SP. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 23-40, 1995.
- RETSEMA, J., GIRARD, A., SCHELKLY, W., MANOUSOS, M., ANDERSON, M.,

- BRIGHT, G., BOROVOY, R., BRENNAN, L. & MASON, R. Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, v.31, p.1939–1947, 1987.
- ROBERTS, R.J., Motile Aeromonad Septicaemia. In: INGLIS, V., ROBERTS, R.J., BROMAGE, N.R. (Ed.). *Bacterial disease of fish*. Oxford: Blackwell Science, Cap. 8, p. 143-55, 1993.
- RODRIGUEZ-RAMILO, S.T. QTL detection for *Aeromonas salmonicida* resistance related traits in turbot (*Scophthalmus maximus*). *BMC Genomics*, v.12, p.541. 2011.
- ROMERO, J., FEIJOÓ, C.G., NAVARRETE, P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives, Health and Environment in Aquaculture, Dr. Edmir Carvalho (Ed.), ISBN: 978-953-51-0497-1, InTech, 2012.
- ROSENFELD, G. Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 20, p. 329-334, 1947.
- SAAD, S. M. I.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. *Rev. Microbiol. São Paulo*, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.
- SAHOO, P.K.; KUMARI, J.; MISHRA, B.K. Non- specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *J. Appl. Ichthyol.* v.21(2), p.151-155, 2005.
- SARAVANAN, M., KARTHIKA, S., MALARVIZHI, A., RAMESH, M. Ecotoxicological impacts of clofibrac acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: Hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *J Hazard Mater.* v.195, p. 188–194, 2011.
- SAURABH e SAHOO, 2008 Shailesh Saurabh and P K Sahoo. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.* v.39, p.223–239, 2008.
- SAYED, A. E. D. H., MEKKAWY, I. A., MAHMOUD, U. M. Histopathological alterations in some body organs of adult *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) exposed to 4-nonylphenol, zoology. In: Garcia MD (ed) zoology. InTech, West Palm Beach, pp 163–184, 2012.
- SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.
- SCHERING-PLOUGH ANIMAL HEALTH. Aquaflor. Florfenicol. Technical Monograph for catfish health professionals, U.S. 36p., 2009.
- SECOMBES, C.J. The fish immune system - the nonspecific immune system: cellular defenses. Academic Press. USA. p.63-103, 1996.
- SEKKING, S., KUM, CAVIT. Antibacterial Drugs in Fish Farms: Application and Its Effects, Recent Advances in Fish Farms, Dr. Faruk Aral (Ed.), ISBN: 978-953-307-759-8, InTech, 2011.
- SHALABY, A. M., KHATTAB, Y.A., ABDEL RAHMAN, A.M. Effects of garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological

parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. v. 12 (2), p. 172-201, 2006.

SHÄPERCLAUS, W., KULOW, H., SCHRECKEBACH, K. Infectious abdominal dropsy. In: SHÄPERCLAUS, W. (Ed.). Fish diseases. Berlin: AkademieVerlag, v.1, p. 401-458, 1992.

SHEPARD, R.M., FALKNER, F.C. Pharmacokinetics of azithromycin in rats and dogs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v. 25(Suppl. A), p. 49–60, 1990.

SHEPARD, R. M., AMACHER, D. E., MULLINS, M. A., FERAINA, R. A., HIGGINS, C. V., JAKOWSKI, A. B. Mechanism of azithromycin tissue uptake and accumulation: subcellular localization of azithromycin in rat liver. In Program and Abstracts of the First International Conference on the Macrolides, Azalides and Streptogramins, Santa Fe, NM, 1992. Abstract 217, p. 50. Wallace Communications, Atlanta, 1992.

SHIKAI I, OHTA Y. New drugs — reports of new drugs recently macrolides need to be taken into account when making approved by the FDA. Dirithromycin. Bioorg Med Chem. v.4, p. 521 – 522, 1996.

SINDAN – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para saúde animal. Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em <<http://www.cpv.com.br/cpv/prodpesquisa.aspx?codigo=2885>> e <<http://www.cpv.com.br/cpv/prodpesquisa.aspx?codigo=2698>>. Acesso em: 25 de maio de 2015.

SOLER, F.; REJA, A.; GARCÍA-RUBIO, L.; MÍGUEZ, M. D. P.; RONCERO, V. Anatomopathological effect of oxytetracycline in tench (*Tinca tinca*). Toxicol. Lett, v. 88, p. 104, 1996.

SOUTHORN, P.; POWIS, G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions, Mayo Clin. Proc. 63, pp. 390–408, 1988.

SVOBODOVÁ, Z.; SUDOVA, E.; NEPEJCHALOVÁ, L.; CERVINKA, S.; VYKUSOVÁ, B.; MODRÁ, H.; KOLÁROVÁ, J. Effects of Oxytetracycline Containing Feed on Pond Ecosystem and Health of Carp (*Cyprinus carpio* L.), Acta Veterinaria Brno, v. 75, p. 571–577, 2006.

TAN, A. S., BERRIDGE, M. V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. J. Immunol. Methods. v.238, p. 59–68, 2000.

TAVARES-DIAS, M., MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, pp.144, 2004.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. v. 13, p. 57-149, 2003.

VERMEULEN, N.P.E. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides, C. (Ed.), Cytochromes P450: Metabolical and toxicological aspects. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 29-53, 1996.

- VICENTINI, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; BOMBONATO, M. T. S.; BERTOLUCCI, B.; LIMA, S. G., SANTOS, A. S. Morphological Study of the Liver in the Teleost *Oreochromis niloticus* Int. J. Morphol., v.23(3), p.211-216, 2005.
- YANO, T. The nonspecific immune system: humoral defense. In: IWAMA G. NAKANISHI, T, editors. The fish immune system: organism, pathogen and environment. San Diego: Academic Press, p. 105-57, 1996.
- YILDIZ, H.Y. Plasma lysozyme levels and secondary stress response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after exposure to Leteux-Meyer mixture. Turk. J. Animal Sci. v.30, p. 265–269, 2006.
- WEBB, S. F. A data-based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. I. Collation of available ecotoxicity data. In: Kümmerer K (ed) Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. Springer, Heidelberg, p.175–201, 2001.
- WHITE, C. C., VIERNES, H., KREJSA, C. M., BOTTA, D., KAVABAGG, D. T. J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. Anal Biochem v.318, p.175–180, 2003.
- WILDFEUER, A., LAUFEN, H., MULLER-WENING, D. HAFERKAMP, O. Interaction of azithromycin and human phagocytic cells. Arzneimittel-Forschung. v.39, p. 755-758, 1989.
- WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses – A comparative approach. Braz. J. Med. Biol. Res. v. 29, p. 1735-1742, 1996.
- ZANUZZO, F.S., URBINATI, E.C., RISE, M.L., HALL, J.R., NASH, G.W., GAMPERL, A.K. *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in Aloe vera fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture. v.435, p.1–9, 2015.
- ZUCKER, E., 1985. Hazard evaluation division. Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for freshwater fish. USEPA publication 540/9-85-006, Washington, 17p. Disponível em:<[www.epa.gov](http://www.epa.gov)>. Acesso em: 18 de março de 2005.