

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

ASPECTOS PATOLÓGICOS DA LACTOCOCOSE EM SURUBIM
HÍBRIDO: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
HISTOPATOLÓGICOS

Robson Andrade Rodrigues

CAMPO GRANDE, MS
2017

2017	ASPECTOS PATOLÓGICOS DA LACTOCOCOSE EM SURUBIM HÍBIDO: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E HISTOPATOLÓGICOS	RODRIGUES
------	---	-----------

Lombada

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ASPECTOS PATOLÓGICOS DA LACTOCOCOSE EM SURUBIM
HÍBRIDO: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E
HISTOPATOLÓGICOS**

Pathological aspects of lactococcosis in hybrid sorubim: Hematological,
biochemical and histopathological parameters

Robson Andrade Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico Fernandes

Co-orientador (a): Profa. Dra. Cristiane Meldau de Campos

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE, MS

2017

Certificado de aprovação

ROBSON ANDRADE RODRIGUES

**Aspectos patológicos da lactococose em surubim híbrido: Parâmetros
hematológicos, bioquímicos e histopatológicos**

**Pathological aspects of lactococcosis in hybrid sorubim: Hematological, biochemical
and histopathological parameters**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
doutor em Ciência Animal.

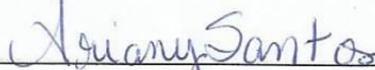
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 29-06-2017

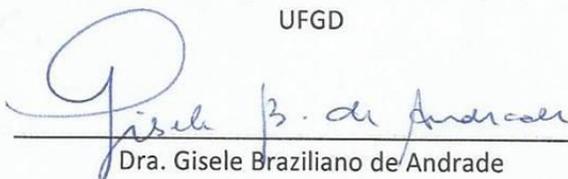
BANCA EXAMINADORA:



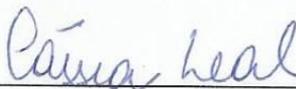
Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
(UFMS) – (Presidente)



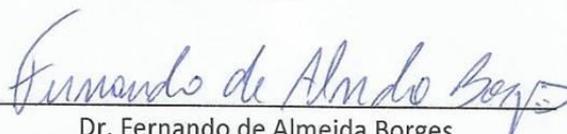
Dra. Ariany Carvalho dos Santos
UFGD



Dra. Gisele Braziliano de Andrade
UCDB



Dra. Cássia Rejane Brito Leal
UFMS



Dr. Fernando de Almeida Borges
UFMS

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Carlos Eurico Fernandes pela orientação, paciência, amizade, ensinamentos e pela constante presença em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho!

A minha esposa, Daniela Ton, pelo incentivo, amizade, paciência e companheirismo ao longo desta caminhada! Sua presença e apoio foram indispensáveis para que esta etapa se concretizasse! Minha eterna gratidão!

À minha mãe Nilda e às minhas irmãs Jack e Karol, que mesmo distantes, sempre me apoiaram!

Aos amigos do LAPEX, André, Mayara, Taynara, Vivian e Karine pela colaboração durante a execução do experimento e coletas. Ao técnico Cláudio pelo auxílio nas rotinas de histologia!

À Dra. Fabiana Pilarski do LAPOA, CAUNESP, pelo fornecimento das cepas de *Lactococcus garvieae* e à Dra. Fernanda de Alexandre Sebastião LAPOA, CAUNESP pela suporte na caracterização genética das cepas e esclarecimento das dúvidas, que foram muitas!

À Dra. Cássia Rejane Brito Leal, LABAC, UFMS pela colaboração nas rotinas de bacteriologia, por sempre estar disposta a nos ajudar e pelo apoio nos momentos em que eu achei que não ia dar certo!

À M.Sc. Kárin Kuibida do Diagnóstico Veterinário pela realização das análises bioquímicas!

À Pirai Piscicultura pelo fornecimento dos espécimes de surubim híbrido do primeiro experimento.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro (Nº processo 23/200.233/2014)

Para cada esforço disciplinado há uma retribuição múltipla.
(Jim Rohn – Livro O monge e o executivo)

Resumo

RODRIGUES, R.A. Aspectos patológicos da lactococose em surubim híbrido: Parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. 2017. 89f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

No presente estudo estão apresentados dois artigos científicos. No primeiro artigo o objetivo foi avaliar as respostas hematológicas e bioquímicas, assim como as alterações histopatológicas no baço e rins de surubins híbridos infectados experimentalmente com *Lactococcus garvieae*. Espécimes de surubim (n= 66; 21,3 ±5,5 g e 17,1 ±1,3 cm) foram inoculados com *L. garvieae* ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e amostrados (n=11) aos 1, 3, 7, 14 e 21 dias pós-inoculação (dpi). O grupo de peixes (n=11) foi amostrado antes da inoculação da bactéria e constituiu o grupo controle. Não houve registro de mortalidade nos peixes inoculados. Os sinais clínicos como hiperemia e pontos hemorrágicos na região ventral, hiperemia nas nadadeiras pélvicas e hemorragia bucal surgiram a partir de 3 dpi. Os peixes inoculados apresentaram anemia caracterizada pela redução dos valores de hemoglobina e número de eritrócitos a partir de 3dpi. Ocorreu redução do percentual de monócitos aos 7, 14 e 21 dpi, de neutrófilos aos 3, 7 e 21 dpi e de linfócitos aos 21 dpi. Baço e rins (cefálico e exócrino) foram severamente afetados pela infecção. No baço foi observada hiperemia, hemorragia e necrose. No rim cefálico foi observada necrose severa, sendo em alguns casos liquefativa e no rim exócrino foi registrada degeneração e necrose dos túbulos, glomérulos e no tecido hematopoiético. Em surubim híbrido a infecção por *L. garvieae* resulta em anemia, monocitopenia, linfocitopenia, neutrofilia, hipoproteïnemia, além de importantes alterações nos tecidos esplênico e renal. No segundo artigo, objetivou-se caracterizar a histologia e a histomorfometria do fígado de surubins híbridos de diferentes categorias (berçário, n = 5; 37,1 ±6,0 g; crescimento, n = 5; 310,4 ±53,8 g e terminação, n = 5; 874,3 ±27,6 g) produzidos em piscicultura. Fragmentos do fígado foram submetidos ao processamento histológico de rotina e corados com hematoxilina e eosina (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e coloração de Perls para a análise histológica, histomorfométrica e de densidade volumétrica das estruturas hepáticas; análise de glicogênio e detecção de ferro férrico (Fe³⁺), respectivamente. O índice hepatossomático reduziu entre as categorias (P<0,01). O percentual de hepatócitos PAS positivos foi superior (P<0,05) nos peixes da categoria de berçário em relação às categorias crescimento terminação. Os hepatócitos de todos os peixes, independentemente da categoria, foram positivos para a coloração de Perls. A densidade volumétrica de hepatócitos e de sinusóides não diferiu (P>0,05). Porém, nos peixes das categorias berçário e crescimento a densidade de veias foi maior (P<0,01) em relação aos peixes da categoria terminação. O perímetro (µm) e a área (µm²) dos hepatócitos, e a área (µm²), o perímetro (µm) e o volume (µm³) do núcleo dos do hepatócitos dos peixes da categoria de terminação foram inferiores (P<0,01) aos peixes das categorias de berçário e crescimento. As diferenças nas características morfométricas dos hepatócitos dos surubins podem ser devido a modificações metabólicas associadas ao crescimento corporal, assim, os parâmetros morfométricos do fígado podem ser utilizados como biomarcadores funcionais para a avaliação da saúde e do estado nutricional de surubins.

Palavras-chave: Doença bacteriana. Estereologia. *Lactococcus garvieae*. *Pseudoplatystoma* spp. Tecido hepático.

Abstract

RODRIGUES, R.A. Pathological aspects of lactococcosis in hybrid sorubim: Hematological, biochemical and histopathological parameters. 2017. 89f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

In the present study two scientific articles are presented. In the first article the objective was to evaluate the hematological and biochemical responses, as well as the histopathological changes in the spleen and kidneys of hybrid sorubim infected experimentally with *Lactococcus garvieae*. Survival specimens (n = 66; 21.3 ± 5.5 and 17.1 ± 1.3 cm) were inoculated with *L. garvieae* (1.5×10^8 CFU mL⁻¹) and sampled (n = 11) at 1, 3, 7, 14 and 21 days after inoculation (dpi). The fish group (n = 11) was sampled prior to inoculation of the bacteria and constituted the control group. No mortality was recorded in the inoculated fish. Clinical signs such as hyperemia and hemorrhagic points in the ventral region, hyperemia in the pelvic fins and oral bleeding appeared from 3 dpi. The inoculated fish presented anemia characterized by the reduction of hemoglobin values and number of erythrocytes from 3dpi. There was a reduction in the percentage of monocytes at 7,14 and 21 dpi, of neutrophils at 3, 7 and 21 dpi and of lymphocytes at 21 dpi. Spleen and kidneys (cephalic and exocrine) were severely affected by infection. In the spleen, hyperemia, hemorrhage, and necrosis were observed. Severe necrosis was observed in the cephalic kidney, and in some cases it was liquefactive and the degeneration and necrosis of the tubules, glomeruli and hematopoietic tissue were recorded in the exocrine kidney. In hybrid sorubim, *L. garvieae* infection results in anemia, monocytopenia, lymphocytopenia, neutrophilia, hypoproteinemia, as well as important changes in the splenic and renal tissues. In the second article aimed to characterize the histology and histomorphometry of the liver of hybrid sorubim of different categories (nursery, n = 5, 37.06 ± 6.00g, growth, n = 5; 310.40 ± 53.80 g and grow-out, n = 5; 874.28 ± 27.59g) reared in captivity. Liver fragments were submitted to histological processing and stained with hematoxylin and eosin (H&E), Schiff's Periodic Acid (PAS) and Perls' staining for histological, histomorphometric and volumetric density analysis of the liver structures; glycogen analysis and detection of ferric iron (Fe³⁺), respectively. The hepatosomatic index decreased among the categories (P < 0.01). The percentage of positive PAS hepatocytes was higher (P < 0.05) in the fish of the nursery category in relation to the growth and grow-out categories. The hepatocytes of all fish, regardless of the category, were positive for Perls' staining. The volumetric density of hepatocytes and sinusoids did not differ (P > 0.05). However, in nursery and growth categories the density of veins was higher (P < 0.01) than the the grow-out category. The perimeter (μm) and area (μm²) of the hepatocytes, and the area (μm²), perimeter (μm) and volume (μm³) of fish nuclei of the termination category were lower (P < 0.01) than fish from the nursery and growth categories. The differences in the morphometric characteristics of the hepatocytes of the sorubim may be due to metabolic modifications associated to the body growth, thus, the morphometric parameters of the liver can be used as functional biomarkers for the evaluation of the health and nutritional status of hybrid sorubim.

Keywords: Bacterial diseases. Histology. *Lactococcus garvieae*. *Pseudoplatystoma* spp. hepatic tissue

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
Doenças bacterianas em peixes no Brasil	5
Bactérias do gênero <i>Lactococcus</i>	6
<i>Lactococcus garvieae</i>	7
Características de <i>L. garvieae</i>	7
Patogenicidade e sinais clínicos	9
Peixes do gênero <i>Pseudoplatystoma</i> spp.	11
Hematologia e bioquímica plasmática em peixes	13
REFERÊNCIAS	17
Respostas hematológicas, bioquímicas e histopatologia de surubim híbrido infectados experimentalmente com <i>Lactococcus garvieae</i>	25
Resumo	25
Introdução	26
Material e Métodos	28
Resultados	32
Discussão	35
Referências	39
Histologia e Histomorfometria do fígado em surubim híbrido (<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> x <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>) produzidos em piscicultura intensiva	56
Resumo	56
Introdução	57
Material e métodos	60
Resultados	63
Discussão	65
Agradecimentos	70
Referências	71

INTRODUÇÃO

Doenças bacterianas em peixes no Brasil

No Brasil, as doenças de origem bacteriana são motivo de preocupação constante, pois podem ocasionar altas taxas de mortalidade nos peixes em suas diversas fases de desenvolvimento (PILARSKI et al., 2011; SEBASTIÃO et al., 2015). No entanto, a escassez de laboratórios especializados em bacteriologia de peixes, dificulta o reconhecimento dos principais agentes etiológicos relacionados às infecções nas pisciculturas brasileiras (FIGUEIREDO e LEAL, 2008).

As bactérias de importância econômica para a produção de peixes no Brasil são em sua maioria, denominadas como oportunistas, pois necessitam de portas de entrada, geralmente causadas pela espoliação por parasitos, ou que o sistema imune não esteja funcionando de maneira adequada, como nos casos de imunossupressão desencadeados por estresse decorrentes de manejos diversos (ISHIKAWA et al., 2012).

Nas pisciculturas brasileiras, as doenças infecciosas, geralmente, estão associadas à bactérias gram-negativas como as pertencentes aos gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Francisella* e à bactérias gram-positivas como as pertencentes ao gênero *Streptococcus* e *Lactococcus* (SEBASTIÃO et al., 2015).

Dentre as bactérias gram-negativas, *Aeromonas hydrophila* causadora de septicemia hemorrágica (GARCIA e MORAES, 2009; SILVA et al., 2012) e *Flavobacterium columnare* responsável pela columnariose (PILARSKI et al., 2008; PILARSKI et al., 2011; SEBASTIÃO et al., 2011) são mais conhecidas e podem acometer várias espécies de peixes (FIGUEIREDO e LEAL, 2008). Já bactérias gram-positivas como do gênero *Streptococcus*, estão associadas a casos de septicemia e meningoencefalite em tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, causadas principalmente pela *Streptococcus agalactiae* (FIGUEIREDO e LEAL, 2012; SEBASTIÃO et al., 2015). Em tilápia do Nilo *O. niloticus*, tambaqui *Colossoma macropomum* e em bagres do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos, as bactérias do gênero *Lactococcus* como *Lactococcus lactis* subespécie *lactis* e *Lactococcus garvieae* tem sido associadas a casos de meningoencefalite infecciosa e septicemia hemorrágica (EVANS et al., 2009; ISHIKAWA et al., 2012; PÁDUA, 2013; SEBASTIÃO et al., 2015; FUKUSHIMA et al., 2017).

As bactérias do gênero *Lactococcus*, como *L. lactis* subespécie *lactis* e *L. garvieae*, podem ser importantes agentes patogênicos para os peixes produzidos no Brasil, principalmente aqueles pertencentes ao gênero *Pseudoplatystoma*. No entanto, a patogenicidade destas bactérias em peixes nativos, permanece, até o momento, desconhecida.

Bactérias do gênero *Lactococcus*

As bactérias do gênero *Lactococcus* foram inicialmente descritas como pertencentes ao grupo láctico do gênero *Streptococcus* (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*). Entretanto, após o isolamento em bovinos leiteiros e produtos lácteos por Schleifer et al. (1985), ocorreu reconhecimento do gênero *Lactococcus*, o qual é composto por sete espécies e subespécies. As espécies *L. garvieae* e *L. lactis* subespécie *lactis*, são relevantes nos processos patológicos relacionados à clínica veterinária e humana, enquanto que *L. lactis* subespécie *cremoris* é utilizada na fermentação de produtos lácteos. *Lactococcus lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum* e *L. raffinolactis* (SCHLEIFER et al., 1985), podem ser encontrados em produtos lácteos fermentados e em algumas plantas. Enquanto que *L. garvieae* e *L. piscium* foram encontrados em peixes e considerados como importantes patógenos para a piscicultura (WILLIAMS et al., 1990; ZLOTOKIN et al., 1998).

As espécies *L. garvieae* e *L. piscium* são importantes para a aquicultura do ponto de vista patológico, pois, ambas as espécies foram associadas a surtos em várias partes do mundo em peixes, camarões e rãs (ELDAR e GHITTINO, 1999; OYAMA et al., 1999; CHEN et al., 2001; BARNES e ELLIS, 2004; MAKI et al., 2008; EVANS et al., 2009; TSAI et al., 2012; TSAI et al., 2013). *L. garvieae* é importante do ponto de vista de saúde pública, uma vez que esta pode desencadear doenças em humanos, sendo considerada, portanto como microrganismo zoonótico (AZEVEDO et al., 2000; WANG et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2009; WATANABE et al., 2011).

Lactococcus garvieae

L. garvieae é o agente etiológico da lactococose, doença que acomete tanto peixes de água doce quanto de água salgada (ELDAR e GITHINNO, 1999; KANG et al., 2004; EVANS et al., 2009; TSAI et al., 2012). Esta espécie também já foi isolada em búfalos com casos de mastite subclínica (TEIXEIRA et al., 1996), em sangue e urina de humanos (AZEVEDO et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2009) e em pacientes com casos de endocardite bacteriana (WATANABE et al., 2011).

Inicialmente *L. garvieae* foi descrita como *Enterococcus* sp. até que foi definitivamente identificada como pertencente ao gênero *Lactococcus* devido a semelhança das características bioquímicas em relação à *E. seriolicida*. Assim esta espécie foi reclassificada como sinônimo de *L. garvieae* (ELDAR et al., 1996).

O primeiro surto causado por *Lactococcus* em peixes foi em 1988 na Espanha em unidades de produção de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Eldar et al. (1999) estudando a biodiversidade de *L. garvieae* pelo mundo isolaram este patógeno na Europa, Ásia e Austrália em várias espécies de peixes de água salgada e de água doce. Em Taiwan *L. garvieae* foi descrita como responsável por surtos em *Macrobrachium rosenbergii* (CHEN et al., 2001), tainha *Mugil cephalus* (CHEN et al., 2002) e truta arco-íris *O. mykiss* (CHANG et al., 2002).

No Brasil, Evans et al. (2009) isolaram *L. garvieae* em tilápia do Nilo, *O. niloticus* e em pintado *Pseudoplatystoma corruscans* doentes. Sendo este o primeiro registro de lactococose no Brasil. Posteriormente Fukushima (2014) relatou o isolamento desta bactéria em surubins e Sebastião et al. (2015) em cachara *P. reticulatum* e tilápia do Nilo *O. niloticus* produzidos no estado de Mato Grosso do Sul e São Paulo, respectivamente.

Características de *L. garvieae*

As características bioquímicas e fisiológicas de *L. garvieae* estão apresentadas na Tabela 1 (VENDELL et al., 2006). Estas bactérias são cocos gram-positivos, que podem estar dispostos pares ou cadeias curtas, são anaeróbios facultativos, não móveis e não formadores de esporos e α -hemolítico em ágar sangue. A faixa de temperatura para o seu crescimento varia de 4°C a 45°C em meios contendo 6,5% de cloreto de sódio em

pH de 9,6 com 40% de bile e em 0,1% de azul de metileno (ELDAR et al., 1996; CHEN et al., 2002; EVANS et al., 2009; AUSTIN e AUSTIN, 2012). O crescimento ótimo ocorre à 37°C em 24 horas, quando à 4°C o crescimento ocorre entre 12 e 15 dias. O rápido crescimento pode ser visualizado em meio ricos como BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*), TSA (*Trypticase-Soy Agar*), TSB (*Trypticase-Soy Broth*) e BEA (*Bile-Esculin Agar*) (ELDAR et al., 1996; VENDRELL et al., 2006; EVANS et al., 2009).

Tabela 1. Características bioquímicas, de cultura e fisiológicas de *L. garvieae*

Características	Reação	Características	Reação
Morfologia celular	Coco-ovóide	Produção de:	
Gram	Positivo	Arginina	+
Motilidade	Não móvel	Ornitina	-
		Lisina	-
Crescimento em:		Formação de ácido a partir de:	
4°C	+	Glicerol	-
20°C	+	Rafinose	-
37°C	+	Arabinose	-
45°C	+	Sorbitol	+
pH 9,6	+	Manitol	+
6,5% NaCl	+	Celobiose	+
Hemólise	α	Galactose	+
Catalase	-	D-glicose	+
Oxidase	-	Maltose	+
TSI	A/A-	Trealose	+
Oxidação(O)/Fermentação (F)	F	D-manose	+
Redução de nitrato	-	Inositol	-
Ureia	-	Lactose	(+)
Produção de indol	-	Ribose	V
Esculina	+	Sucrose	V
VP	+	Adonitol	-
Produção de H ₂ S	-	Glicogênio	-
Arginina de-hidrolase	+	Melibiose	-
Pirrolidonil arilamidase	+	Melezitose	-
Fosfatase alcalina	-	Amido	-
β -glucoronidase	V	Tagatose	V
Leucina arilamidase	+	L- ramnose	-
Hidrólise de hipurato de sódio	-	D-xilose	-
Grupo Lancefield	N	Salicina	+

V: Reação variável; (): reação fraca ou lenta; A/A-: Acidificação do meio TSI sem produção de H₂S.
Fonte: Vendrell et al. (2006).

Patogenicidade e sinais clínicos

A patogenicidade de *L. garvieae* varia em função da espécie e idade do peixe e das características relacionadas à própria bactéria, como a presença de cápsula e perfil de toxinas produzidas. Características ambientais relacionadas a água de cultivo também podem influenciar no desenvolvimento da infecção, como por exemplo a temperatura da água de cultivo (VENDRELL et al., 2006; ALGÖET et al. 2009).

A virulência de *L. garvieae* parece estar relacionada a presença de uma cápsula de exopolissacarídeos a sua volta (BARNES et al., 2002). As cepas encapsuladas (KG-) são mais virulentas em relação às cepas não encapsuladas (KG+), conforme demonstrado no estudo desenvolvido por Kang et al. (2004). Estes autores demonstraram que *Sebastes schlegeli* infectados experimentalmente com cepa encapsulada de *L. garvieae* (1×10^7 UFC peixe⁻¹) apresentaram mortalidade acumulada superior (100%) em relação aos peixes infectados com cepas não encapsuladas (60%). O mesmo foi observado por Tsai et al. (2012), em seu trabalho, os autores relatam que as cepas encapsuladas ocasionaram maior taxa de mortalidade em tainha *M. cephalus*, tilápias e camarão *M. rosenbergii* em relação aos isolados não encapsulados. A presença da cápsula dificulta a ocorrência opsonofagocitose pelos fagócitos do rim cefálico, conforme o demonstrado por Yoshida et al. (1997) em *Seriola quinqueradiata* infectados com *E. seriolicida* (= *L. garvieae*).

O perfil de toxinas produzidas e secretadas pelas bactérias do gênero *Streptococcus* está relacionado com o surgimento dos sinais clínicos e ocorrência de mortalidade nos peixes acometidos por estas bactérias. Segundo Kusuda e Hamaguchi (1988) as toxinas extracelulares produzidas por *Streptococcus* apresentam atividade hemolítica e, portanto, são responsáveis pelas lesões, especialmente hemorrágicas. Por outro lado as toxinas intracelulares apresentam atividade leucocida, ou seja, atuam sobre a destruição de leucócitos, como monócitos, neutrófilos e linfócitos. A atividade leucocida das toxinas é importante para o desenvolvimento da doença, pois pode desencadear um quadro de imunossupressão.

As características ambientais também foram relacionadas à patogenicidade de *L. garvieae*. Os surtos causados por esta bactéria em unidades produtoras de truta geralmente ocorrem no verão quando há o aumento da temperatura água de cultivo. Neste período, a temperatura da água pode atingir ou superar os 18°C. Embora tenham sido registrados surtos em temperaturas menores como 13,5°C (DIDINEN et al., 2014)

e a partir de 14°C (SOLTANI et al., 2008). Estas informações são corroboradas pelos dados apresentados por Algöet et al. (2009). Estes autores demonstraram que trutas arco-íris inoculadas com *L. garvieae* e mantidas em água com temperatura de 16 a 18°C apresentam maior taxa de mortalidade quando comparadas aos peixes mantidos na faixa de temperatura de 12 a 14°C.

As informações acima relatadas são provenientes de trabalhos realizados com espécies de peixes de clima temperado, cujas condições de cultivo são bastante distintas das observadas no Brasil. As informações a respeito da patogenicidade da *L. garvieae* ainda são escassas no Brasil. Até o momento, existem apenas dois trabalhos que relatam o quão patogênica esta bactéria pode ser. Em estudo realizado nos EUA com cepas provenientes de peixes produzidos no Brasil, Evans et al. (2009) demonstraram que a cepa de *L. garvieae* isolada do pintado *P. corruscans* apresentou baixa virulência quando inoculada em exemplares de tilápia do Nilo *O. niloticus*. Enquanto que a cepa isolada da tilápia do Nilo *O. niloticus* quando inoculada na mesma espécie apresentou alta virulência ocasionando taxa de mortalidade superior a 40%.

No Brasil, o primeiro estudo a avaliar o potencial patogênico de *L. garvieae* por meio de infecção experimental utilizando o surubim híbrido *P. reticulatum* x *P. corruscans* como hospedeiro foi desenvolvido por Fukushima et al. (2017). Estes autores obtiveram as cepas de *L. garvieae* a partir de exemplares de cachara *P. reticulatum* e surubim híbrido diagnosticados com septicemia hemorrágica e meningoencefalite. Em peixes com peso médio de 10,3 g e desafiados com *L. garvieae* na concentração de $5,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ estes autores verificaram a alta patogenicidade desta bactéria, sendo a taxa de mortalidade de 66% (8/12). Já em peixes com $40,0 \pm 6,3$ g, inoculados com *L. garvieae* na concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ a taxa de mortalidade observada foi de 36,7%. Além disso, também foi observada a presença de peixes assintomáticos.

De uma maneira geral peixes infectados por cocos gram-positivos apresentam como sinais clínicos: hemorragia, oftalmite e congestão nos órgãos internos, letargia, escurecimento do tegumento, natação errática, exoftalmia e catarata (CHEN et al., 2002; VENDRELL et al., 2006). Peixes infectados por *L. garvieae* podem apresentar todos os sinais clínicos supracitados, além de edema intra-cranial, enterite, meningite aguda caracterizada pela presença de exudato e colônias distribuídas na superfície das meninges e também nos espaços de Virchow, sendo este fato responsável pela letargia e pela desorientação apresentada pelo peixe (ELDAR & GHITTINO, 1999; CHEN et al.,

2002; PEREIRA et al., 2004). Enquanto que *M. rosenbergii* infectados apresentam como sinal clínico musculatura opaca e esbranquiçada (TSAI et al., 2012). Ascite com exsudato amarelado na cavidade abdominal e epicárdio também podem ser observados (AGUADO-URDA et al., 2014).

Internamente, fígado, rim e baço podem ser severamente danificados em casos de lactococose. Geralmente observa-se aumento dos rins e baço, intensa congestão, além de pontos de hemorragia (CHEN et al., 2002; AGUADO-URDA et al., 2014; DIDINEN et al., 2014). Avci et al. (2013) descreveram detalhadamente os sinais clínicos observados durante infecção generalizada em juvenis e adultos de truta arco íris infectados experimentalmente com *L. garvieae*:

Olhos: exoftalmia, hemorragia periorbital, alteração vascular, infiltrado de células, e presença de bactéria no tecido;

Pele: hiperemia e hemorragia nas nadadeiras e ao redor do ânus, despigmentação alteração vascular, infiltrado de células, e presença de bactéria no tecido;

Brânquias: petéquias hemorrágicas, hiperemia e hemorragia; palidez, edema e bactéria no tecido;

Músculo: hemorragia, alteração vascular e bactéria no tecido;

Coração: hemorragia na cavidade pericárdica, epicardite, ativação de macrófagos endoteliais e presença de bactéria no tecido;

Baço: Congestão, alteração vascular, necrose e presença de bactéria no tecido;

Fígado: petéquias hemorrágicas, mudança de coloração, alteração vascular, necrose celular, infiltrado lipídico e celular; e bactéria no tecido;

Rim: alteração vascular, degeneração epitelial, aumento dos centros melanomacrófagos e bactéria no tecido;

Intestino e estômago: hemorragia intestinal, conteúdo sanguíneo no intestino, necrose das células da submucosa epitelial do estômago e bactéria no tecido;

Bexiga natatória: hemorragia, alteração vascular, peritonite, espessamento da bexiga natatória e bactéria no tecido.

Peixes do gênero *Pseudoplatystoma* spp.

Os peixes do gênero *Pseudoplatystoma* são popularmente conhecidos como “surubins”. Estes peixes carnívoros, de grande porte, pertencem à família Pimelodidae,

e podem encontrados nas bacias hidrográficas da América do Sul (BUITRAGO-SUÁREZ e BURR, 2007).

No Brasil, os surubins são bastante valorizados comercialmente, no entanto, a produção das espécies puras, como pintado *P. corruscans* e cachara *P. reticulatum* é pouco praticada, sendo o mais comum a produção do híbrido intragênero, ou seja, um peixe híbrido oriundo do cruzamento da fêmea de *P. reticulatum* com o macho de *P. corruscans* que recebe a denominação comercial de "pintado", “ponto e vírgula” ou “cachapira”. (CAMPOS, 2013)

As espécies puras e seu híbrido são interessantes para a piscicultura comercial devido às características zootécnicas satisfatórias. Estes peixes apresentam alta taxa de crescimento (BARBOSA et al., 2011; ISHIKAWA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014) e rendimento de processamento satisfatório (FANTINI et al., 2013). Além disso, as características organolépticas e nutricionais de sua carne, como ausência de espinhos intramusculares despertam o interesse do consumidor. Nos últimos anos, houve crescimento na produção de peixes do gênero *Pseudoplatystoma*, principalmente na região Centro-Oeste seguida pela região Norte (Tabela 2).

Tabela 2. Produção (em toneladas) de peixes do gênero *Pseudoplatystoma* spp. (pintado, cachara, pintachara, cachapira e surubim) em cada região do Brasil

Região	Ano		
	2013	2014	2015
Sul	138,5	149,6	158,9
Sudeste	57,8	57,1	64,3
Centro-Oeste	13.028,8	18.403,1	12.115,1
Norte	2.236,4	1.565,2	5.795,8
Nordeste	253,2	262,2	220,5
Total	15.714,7	20.437,2	18.354,6

Fonte: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS (2016).

Embora estado de Mato Grosso do Sul apresente infraestrutura nos vários seguimentos da cadeia produtiva da piscicultura, como fábrica de ração, fazendas de reprodução e frigorífico certificado, ainda existem alguns entraves relacionados a produção dos surubins, principalmente no que se refere aos aspectos sanitários. A consolidação da produção industrial destes peixes é dependente da produção constante de juvenis saudáveis de forma a atender a demanda de animais para a terminação (PÁDUA, 2013). Neste contexto, para o sucesso da produção é necessário o

conhecimento das particularidades da biologia destes peixes, bem como das principais doenças, especialmente as bacterianas, que podem acometê-los, em suas várias fases de desenvolvimento. Embora a fase inicial de produção seja considerada a mais delicada pelo fato dos juvenis serem mais sensíveis às doenças infecciosas de etiologia parasitária e/ou bacteriana (CAMPOS et al., 2014).

Em surubins as principais doenças bacterianas estão associadas a bactérias oportunistas. Casos de septicemia hemorrágica, caracterizados pela ocorrência de hemorragia na superfície corporal, nadadeiras e cavidade celomática, além de úlceras hemorrágicas no tegumento, cavidade bucal e opérculo estão geralmente associados às bactérias do gênero *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Edwardsiella* (ISHIKAWA et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Outra doença comum, principalmente na fase inicial é a columnariose, doença ulcerativa não hemorrágica caracterizada pela corrosão das nadadeiras, pele e necrose branquial causada pela bactéria gram negativa *F. columnare* (PILARSKI et al., 2011). Esta doença é comumente observada em alevinos após o manejo de classificação dos alevinos, devido ao estresse e perda do muco que protege a pele dos peixes. Embora sejam menos comuns, as bactérias do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus* foram isolados durante surtos de meningoencefalite bacteriana, ocorridos em fazendas-berçários nos estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Os surtos ocorreram em períodos de alta temperatura da água e em muitos casos após o manejo de classificação dos alevinos (ISHIKAWA et al., 2012; PÁDUA 2013).

Hematologia e bioquímica plasmática em peixes

A utilização da hematologia clínica na pesquisa animal principalmente para auxiliar no diagnóstico de doenças em animais, é bastante consolidada. O contato constante do sangue com os demais tecidos do organismo, com exceção dos tecidos epitelial e cartilaginoso, o qualifica como biomarcador dos processos vitais (RANZANI-PAIVA et al. 2013).

A ictiohematologia constitui uma importante ferramenta na avaliação do estado de saúde dos peixes e é aplicável ao diagnóstico e prognóstico de várias enfermidades (ISHIKAWA et al., 2011; SERIANI e RANZANI-PAIVA, 2012). No entanto, a

avaliação das alterações dos componentes sanguíneos frente à infecções bacterianas é menos usual em relação às infecções parasitárias (CAMPBELL, 2006).

O sangue é um tecido conectivo, cuja matriz extracelular, denominada plasma, é composta por 90% de água, 7% de proteínas (globulinas e albumina), além de hormônios, enzimas e eletrólitos variados. Eritrócitos, leucócitos e trombócitos, denominados elementos figurados, também fazem parte do sangue (RANZANI-PAIVA, 2007). Nos teleósteos, o rim cefálico e o baço são os principais órgãos hematopoiéticos, sendo os centros hematopoiéticos destes órgãos responsáveis pela origem e formação dos elementos figurados do sangue (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Os eritrócitos maduros são as células mais numerosas, e apresentam como principal função o transporte de oxigênio até os tecidos, e retirada do gás carbônico destes por ação da hemoglobina (RANZANI-PAIVA, 2007). Os leucócitos e trombócitos são denominados como células orgânicas de defesa (TAVARES-DIAS et al., 2002) e compõe o sistema imune inespecífico.

Os parâmetros que compõe o eritrograma, como hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média são utilizados para a caracterização de processos anemiantes (CLAUSS et al., 2008). Enquanto que no leucograma, a determinação dos valores relativos e absolutos dos leucócitos circulantes, auxilia no diagnóstico de processos infecciosos de etiologia parasitária e ou bacteriana, assim como na avaliação de desequilíbrio da homeostase, verificado após eventos de estresse (TAVARES-DIAS et al., 2009; GRANT, 2015).

Os leucócitos compõe parte da defesa imunológica dos peixes e fazem parte da resposta imune inespecífica mediada por células. Os principais leucócitos observados na corrente sanguínea dos peixes são monócitos e linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, célula granulocítica especial ou leucócito granular PAS-positivo (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). Além destas, podem ser observados leucócitos imaturos, e heterófilos, cuja ocorrência é restrita aos peixes do gênero *Brycon* (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Os linfócitos são os leucócitos predominantes na circulação dos peixes e são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos, aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune, como as linfocinas (YOSHINAGA et al., 1994; HUBREC & SMITH, 2010).

Os monócitos são considerados como células em trânsito na circulação sanguínea e também podem ser encontrados no rim e cavidade peritoneal (SECOMBES, 1996). Estas células podem diferenciar-se em macrófagos e então migrar para os tecidos durante o processo inflamatório. No foco inflamatório, estas células fagocitam qualquer material estranho, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos (DIAS et al., 2011; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Os basófilos, eosinófilos e neutrófilos são granulócitos com capacidade fagocítica (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). Os basófilos e eosinófilos apresentam a atividade fagocítica menos pronunciada. Estas células são encontradas em pequenas quantidades no sangue circulante. O aumento no número de eosinófilos está correlacionado com a ocorrência de parasitose, enquanto que o de neutrófilos está relacionada a presença de bactérias (RANZANI-PAIVA et al., 1999; CLAUSS et al., 2008).

Os neutrófilos são os leucócitos de maior capacidade migratória, visto que são os primeiros a deixar a circulação e migrar para o foco inflamatório, é por este motivo que esta célula é considerada como uma das mais importantes no processo infeccioso. Durante infecções bacterianas é comum ocorrer o aumento no valor de neutrófilos circulantes, também denominado como neutrofilia (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). O aumento destas células geralmente ocorre devido a sua maior demanda no processo inflamatório, principalmente para fagocitose de bactérias (HUBREC & SMITH, 2010; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Análises bioquímicas são imprescindíveis no diagnóstico de doenças em humanos e animais. No entanto, em peixes a determinação do perfil bioquímico não faz parte da avaliação clínica de rotina, embora seja uma importante ferramenta no monitoramento das alterações fisiológicas e patológicas decorrentes de doenças bacterianas (ŘEHULKA, 2002; ŘEHULKA e MINAŘIC, 2007 YU et al., 2010) e virais (ŘEHULKA, 2003).

A ausência de intervalos de referência para a correta interpretação dos dados obtidos dificulta a adoção dos exames bioquímicos no diagnóstico laboratorial. Semelhante ao que ocorre na hematologia, informações a respeito dos padrões dos parâmetros bioquímicos estão centrados em espécies de relevância econômica como salmão, truta, carpa, peixe dourado, Koi e bagre do canal (CAMPBELL, 2006).

Além disso, é necessário verificar e padronizar quais os parâmetros bioquímicos que possuem valor de diagnóstico nas doenças comumente observadas nos peixes. Na medicina veterinária, os testes bioquímicos para avaliação da função renal são ureia e creatinina, principalmente (MEYER et al., 1995; FETTMAN e REBAR, 2006). Segundo Campbell (2006) em peixes, tanto a ureia quanto a creatinina plasmática, podem não ser bons indicadores no diagnóstico de doenças renais, uma vez que os rins pouco contribuem na excreção de produtos nitrogenados. Embora seja necessário o desenvolvimento de estudos a cerca das nefropatias em peixes para verificar esta afirmação.

As proteínas plasmáticas integram os exames laboratoriais realizados em animais domésticos ou não (LASSEN, 2006). No plasma dos peixes, a albumina e as globulinas são os principais tipos de proteínas. A albumina é encontrada em maior quantidade do que as globulinas (LABARRÈRE, 2011). É a albumina que mantém a pressão oncótica do sangue, impedindo que a água passe deste para os tecidos. Sua síntese ocorre no fígado e a sua metabolização ocorre em vários tecidos (LASSEN, 2006). As globulinas formam um grupo diversificado de proteínas grandes. Estas abrangem diversos tipos de moléculas de anticorpos e de outras proteínas com função imunológica como complemento. As globulinas podem ser classificadas em alfa, beta e gama globulinas de acordo com a sua mobilidade eletroforética (LABARRÈRE, 2011).

Frente a doenças parasitárias e/ou bacterianas observa-se alteração nos teores das proteínas plasmáticas em peixes. Em infecções bacterianas caracterizadas por quadros hemorrágicos ou não, o teor de proteína plasmática total tende a reduzir (ŘEHULKA, 2002; ŘEHULKA e MINAŘIC, 2007; GARCIA e MORAES, 2009; TAVARES-DIAS et al., 2009). Por outro lado, em peixes parasitados por *Dolops carvalhoi*, TAVARES-DIAS et al. (2007) observaram aumento da proteína total (PPT) em tambacu híbrido, enquanto que em *Lutjanus guttatus* infectados por monogêneas o teor de PPT permaneceu inalterado (RIO-ZARAGOZA et al., 2010).

REFERÊNCIAS

- AGUADO-URDA M.; RODRÍGUEZ-BERTOS A.; HERAS A.I. et al. Experimental *Lactococcus garvieae* infection in zebrafish and first evidence of its ability to invade non-phagocytoc cells. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p.248-254, 2014.
- ALGÖET, M.; BAYLEY, A. E.; FEIST, S. W. et al. Susceptibility of selected freshwater fish species to a UK. *Lactococcus garvieae* isolate. **Journal of Fish Diseases**, v.32, p.825–834, 2009.
- AUSTIN, B.; AUSTIN D.A. Bacterial fish Pathogens- Disease of Farmed and Wild Fish.5th ed. Dordrecht: Springer, 2012. 678p.
- AVCI H.; BIRINCIOLU S.S.; TANRIKUL T.T. et al. Experimental *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792: a comparative histopathological and immunohistochemical study. **Journal of Fish Diseases**, v. 37, p. 481-495, 2013.
- AZEVEDO, P.A.; PERIN, C.; BECKER, F.L. et al. Isolamento e caracterização de *Lactococcus garvieae*. **Revista AMRIGS**. v. 44.p. 81-84, 2000.
- BARBOSA, O. N.; RAIZER, J.; GONDA, M. F. et al. Desempenho e coeficiente intestinal de alevinos puros e híbridos de pintados em condicionamento alimentar. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 40, p. 2621-2627, 2011.
- BARNES A.; GUYOT C.; HANSEN B.G. et al. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsu late and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.12, p. 155-168, 2002.
- BARNES, A. C.; ELLIS, A. E. Role of capsule in serotypic diferences and complement fixation by *Lactococcus garvieae*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 16. p. 207-214, 2004.
- BUITRAGO–SUÁREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p. 1-8, 2007.

CAMPBELL, T. W. Bioquímica Clínica de Peixes e Anfíbios. In: TRHALL, M.A. (ed.). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 467-472.

CAMPOS CM, RODRIGUES RA, SANCHEZ MSS et al. Pesquisas com sanidade em cachara e seu híbrido. In: MADI RR, CAMPOS CM, LIZAMA MAP et al (Eds). **Patologia e Sanidade em Ambientes Aquáticos**. 1 .ed. Maringá: Massoni. 2014. p. 157-184.

CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Orgs). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2.ed. Santa Maria: Editora UFSM. 2013. p. 335-358.

CHANG, P.H.; LIN C.W.; LEE, Y.C. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. **Bulletin of The European Association of Fish Pathologists**, v. 22, p.319–326, 2002.

CHEN, S-C.; LIAW, L-L.; SU, H-Y. et al. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, v.25. p. 727-732, 2002.

CHEN, S-C.; LIN, L-D.; LIAW, L-L. et al. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 45.p. 45-52, 2001.

CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.11, p. 445-462, 2008.

DIAS, D. C.; TACHIBANA, L.; SERIANI, R. et al. Tempo de migração dos macrófagos em matrinxã, *Brycon amazonicus*, por meio da técnica de inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Amazonica**, n. 3, v. 41, p.421-424, 2011.

DIDINEN B.I.; YARDIMCI B.; ONUK E.E. et al. Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972): New histopathological observations, phenotypic and molecular identification. **Revue de médecine vétérinaire**, v.165, p. 12-19, 2014.

ELDAR, A.; GHITTINO, C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. **Disease of Aquatic Organisms**. v. 36. p. 227-231, 1999.

ELDAR, A.; GHITTINO, C.; ASANTA, L. et al. *Enterococcus seriolicida* Is a Junior Synonym of *Lactococcus garvieae*, a Causative Agent of Septicemia and Meningoencephalitis in Fish. **Current Microbiology**, v. 32. p. 85–88, 1996.

ELDAR, A.; GORIA, M.; GHITTINO, C. et al. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Fish in Europe, Asia and Australia. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65. p. 1005-1008, 1999.

EVANS, J.J. KLESIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, v. 32. p. 943-951, 2009.

FANTINI, L.E.; RODRIGUES, R.A.; NUNES, A.L. et al. Rendimento de carcaça de surubins *Pseudoplatystoma* spp. produzidos em tanque rede e viveiro. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.14, p.538-545, 2013.

FETTMAN, M.J.; REBAR, A. Avaliação laboratorial da função renal. In: TRHALL, M.A. (ed.). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 285-310.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Infecções por *Streptococcus* spp. em peixes. In: SILVA-SOUZA, A.T.; LIZAMA, M.A.P.; TAKEMOTO, R.M. (Orgs). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos** Maringá: Ed. Massoni, 2012. p.275-292.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicada em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.08-14, 2008.

FUKUHIMA, H.C.S.; LEAL C.A.G.; CAVALCANTE R.B. et al. *Lactococcus garvieae* outbreaks in Brazilian farms Lactococcosis in *Pseudoplatystoma* sp.- development of an autogenous vaccine as a control strategy. **Journal of Fish Diseases**, v.40, p. 263-272, 2017.

FUKUSHIMA, H.C.S. Eficácia de duas formulações de vacinas autógenas para o controle da lactococose em surubins híbridos *Pseudoplatystoma corruscans* x

Pseudoplatystoma reticulatum. 79f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2014.

GARCIA, F.; MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.31, p.17-21, 2009.

GRANT, K. R. Fish hematology and associated disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.18, p. 83-103, 2015.

HUBREC, T. C.; SMITH S. A. Hematology of Fishes. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Veterinary Hematology**. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. p. 994-1003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, 2016.

ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B., SATAKE, F.; MARTINS, M.L.; TAVARES-DIAS, M. Identificação morfológica de organismos semelhantes à Anaplasmataceae em monócitos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. coruscans*). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, p. 225-228, 2011.

ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B.; VENTURA, A.S. et al. **Biologia e Estratégias na Sanidade de Alevinos de Bagres Carnívoros**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2012. 47p. (Embrapa Agropecuária do Oeste: Documentos, 111).

KANG, S-H.; SHIN, G-W.; SHIN, Y-S. et al. Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Journal of Veterinary Sciences**, v. 5. p. 387-390, 2004.

KUSUDA K.; HAMAGUCHI M. Extracellular and intracellular toxins of *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail. **Bulletin European Association of Fish Pathologists**, v.8, p.9-10, 1988.

LABARRÈRE, C.R. **Perfil sanguíneo de híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. coruscans*) criados em diferentes densidades de estocagem**. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.

LASSEN, E.D. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: TRHALL, M.A. (ed.). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 335-354.

MAKI, T.; HIRONO, I.; AOKI, T. Drug resistance mechanism of the fish-pathogenic bacterium *Lactococcus garvieae*. **Journal of Fish Diseases**. v. 31. p. 461-468, 2008.

MEYER, D.J., COLES, E.H., RICH L.J. **Medicina de Laboratório Veterinária**. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

OLIVEIRA, A.M.S.; OLIVEIRA, C.A.L.; RODRIGUES, R.A. et al. Crescimento de juvenis de *Pseudoplatystoma reticulatum* e *Pseudoplatystoma* spp. em viveiro. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p.1091-1098, 2014.

OOYAMA, T.; KERA, A.; OKADA, T. et al. The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. **Disease of Aquatic Organisms** v. 37. p. 121-126, 1999.

PÁDUA, S. B. **Doenças bacterianas em bagres sul americanos: isolamento, caracterização e patogenia**. 2013. 67p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, Jaboticabal.

PEREIRA F.; RAVELO C.; TORANZO A.E.; ROMALD J.L. *Lactococcus garvieae*, and emerging pathogen for the Portuguese trout culture. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v.24, p. 274-279, 2004.

PILARSKI, F.; ISHIKAWA, M.M.; SEBASTIÃO, F.A. et al. Columnariose: Etiologia Sinais Clínicos e Envio de Amostras para a Análise Laboratorial. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 32p. (Embrapa Agropecuária do Oeste: Documentos, 109).

PILARSKI, F.; ROSSINI, A.J.; CECCARELLI, P.S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 409-414, 2008.

RANZANI-PAIVA M.J.T.; PÁDUA S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1.ed. Maringá: Eduem, 2013. 135p.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In: Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 2., 2007. **Anais..** Botucatu, São Paulo. Universidade Estadual Paulista, 74p.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J. C. et al. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e

tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 25, p.77 - 83, 1999.

ŘEHULKA, J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haemathology and Biochemistry. **Acta Veterinaria BRNO**, v.71, p.351-360, 2002.

ŘEHULKA, J. Haematological analyses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* affected by viral haemorrhagic septicaemia (VHS). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.56, p. 185-193, 2003.

ŘEHULKA, J.; MINAŘIC, B. Blood parameters in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1815), affected by columnaris disease. **Aquaculture Research**, v.38, p.1182-1197, 2007.

RIO-ZARAGOZA, O.B.D.; FAJER-AVILA, E.J.; ALMAZÁN-RUEDA, P. Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). **Aquaculture Research**, v.41, p. 1592–1601, 2010.

SCHLEIFER, K. H.; KRAUS, J.; DVORAK, C. et al. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.6. p. 183-195, 1985.

SEBASTIÃO, F. A.; NOMURA, D.; SAKABE, R.; PILARSKI, F. Hematology and productive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.282-289, 2011.

SEBASTIÃO, F.A.; FURLAN, L.R.; HASHIMOTO, D.T.; PILARSKI, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, v.5, p.409-424, 2015.

SECOMBES, C. J. The Nonspecific Immune System: Cellular Defenses. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. London: Academic Press, 1996. p. 63-105.

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Alterações hematológicas em peixes: aspectos fisiopatológicos e aplicações em ecotoxicologia aquática. In: SILVA-SOUZA,

A.T.; LIZAMA, M.A. P.; TAKEMOTO, R.M. (Orgs). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá: Ed. Massoni, 2012. p. 221-242.

SILVA B.C.; MOURIÑO J.L.P.; VIEIRA F.N. et al. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v.42, p. 908-916, 2012.

SOLTANI, M.; NIKBAKHT G.; MOUSAVI, H.A.E.; AHMADZADEH, N. Epizootic outbreaks of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. **Bulletin of The European Association of Fish Pathologists**, v.28, p. 207-212, 2008.

TAVARES-DIAS, M., ISHIKAWA, M. M. MARTINS, M. L. et al. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN-NETO, A; MARIANO, W.S.; POZZOBON-SORIA, S.F. (Org.). **Tópicos especiais em saúde e criação animal**. 1ª ed. São Carlos: Pedro & João Editores, 2009, v. 1, p. 43-80. 2009.

TAVARES-DIAS, M.; F. MORAES, F.R.; ONAKA, E.M. et al. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, p. 355-363, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, v. 32, p. 693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: Marcos Tavares-Dias, 2004. 144p.

TEIXEIRA, C.D.; NEVES, F.P.G.; ROCHA, F.S.P. et al. *Lactococcus garvieae*: isolamento e caracterização fenotípica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.41. p. 205-207, 2009.

TEIXEIRA, L.M.; MERQUIOR, V.L.; VIANNI, M. C. et al. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from waters buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 664-668, 1996.

TSAI, M-A.; WANG, P-C.; YOSHIDA, T. et al. Development of a sensitive and specific LAMP PCR assay for detection of fish pathogen *Lactococcus garvieae*. **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 102. p. 225-235, 2013.

TSAI, M-I.; WANG, P-C.; LIAW, L-L. et al. Comparison of genetic characteristics and pathogenicity of *Lactococcus garvieae* isolated from aquatic animals in Taiwan. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 102. p. 43-51, 2012.

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I. et al. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.29, p.177-198, 2006.

WANG, C-Y. C; SHIE, H-S.; CHEN, S-C. et al. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible associaton with aquaculture outbreaks. **International Journal of Clinical Practice**. v. 61. p. 60-73, 2007.

WATANABE, Y.; NAITO, T.; KIKUCHI, K. et al. Infective endocarditis with *Lactococcus garvieae* in Japan: a case report. **Journal of Medical Case Reports**. v. 5. p. 356-360, 2011.

WILLIAMS, A.M.; FREYER, J.L.; COLLINS, M.D. *Lactococcus piscium* sp. nov., a new *Lactococcus* species from salmonid fish. **FEMS Microbiology**. v. 68. p.109–114, 1990.

YOSHIDA T.; ENDO M.; SAKAI M.; INGLIS V. A cell capsule with possible involvement inresistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 29, p.233-235, 1997.

YOSHINAGA, K.; OKAMOTO, N.; KURATA, O. et al. Individual variations of Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. **Fish Pathology**, v.29, p.1-4, 1994.

YU, J.H.; HAN, J.J.; PARK, S.W. Haematological and biochemical alterations in Korean catfish, *Silurus asotus*, experimentally infected with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 295-302 2010.

ZLOTKIN, A.; ELDAR, A.; GHITTINO, C. et al. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, p. 983-987, 1998.

ARTIGO I

Respostas hematológicas, bioquímicas e histopatologia de surubim híbrido infectados experimentalmente com *Lactococcus garvieae*¹**Resumo**

Avaliamos as respostas hematológicas, bioquímicas e histopatologia de baço e rins (cefálico e exócrino) de espécimes de surubim híbrido (n= 66; 21,31 ±5,54 g 17,14 ±1,27 cm) infectados experimentalmente com *Lactococcus garvieae*. Os peixes foram inoculados com *L. garvieae* ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e amostrados aos 1, 3, 7, 14 e 21 dias pós-inoculação (dpi). O grupo de peixes amostrado antes da inoculação constituiu o grupo controle. Não houve registro de mortalidade nos peixes inoculados, e à partir de 3 dpi, surgiram os primeiros sinais clínicos, como hiperemia e pontos hemorrágicos na região ventral, hiperemia nas nadadeiras pélvicas e hemorragia bucal. Observou-se ainda redução do hematócrito (1, 3 e 14 dpi), hemoglobina e número de eritrócitos (3, 14 e 21 dpi), hipoglicemia (3 dpi) e hipoproteinemia (14 dpi). Houve redução de monócitos aos 7, 14 e 21 dpi; de neutrófilos aos 3, 7 e 21 dpi e de linfócitos aos 21 dpi. Hiperemia, hemorragia, infiltrado inflamatório e necrose foram as principais alterações observadas nos órgãos estudados. A infecção experimental por *L. garvieae* em surubim híbrido resulta em anemia, monocitopenia, linfocitopenia, neutrofilia, hipoproteinemia, além de importantes alterações nos tecidos esplênico e renal entre 3 e 21 dias pós-infecção.

Palavras-chaves: lactococose, *Pseudoplatystoma* spp., leucócitos, tecido renal, baço.

¹Manuscrito elaborado segundo as normas do Journal of Fish Diseases (ISSN: 1365-2761).

Introdução

A lactococose é uma doença infecciosa caracterizada pelo quadro de septicemia hemorrágica e meningoencefalite causada pela bactéria gram positiva *Lactococcus garvieae*. Esta bactéria pode acometer tanto peixes de água doce quanto de água salgada (Eldar & Githinno 1999; Kang *et al.* 2004; Evans, Klesius & Shoemaker 2009; Tsai *et al.* 2012) e também pode ser patogênica para outros animais terrestres (Kawanishi *et al.* 2006) incluindo seres humanos (Wang *et al.* 2007; Watanabe *et al.* 2011).

A patogênese da lactococose para peixes de clima temperado está bem descrita. A infecção é comumente registrada em *Oncorhynchus mykiss* (Pereira *et al.* 2004; Kav & Erganis 2008), *Mugil cephalus*, *Seriola quinqueradiata* (Chen *et al.* 2002), *Chelon alatus*, *Oreochromis niloticus* (Tsai *et al.* 2012) e *Macrobrachium rosenbergii* (Chen *et al.* 2001). A ocorrência da infecção está associada a condições ambientais desfavoráveis e situações estressantes comuns dos sistemas de produção (Vendrell *et al.* 2006). Os surtos geralmente ocorrem durante os meses de verão quando a temperatura da água de cultivo tende a permanecer acima de 18°C (Algöet *et al.* 2009; Castro *et al.* 2017), e a evolução da doença também está relacionada com a má qualidade da água, principalmente, baixo teor de oxigênio dissolvido e excesso de amônia (Vendrell *et al.* 2006).

A lactococose pode se apresentar de forma aguda ou crônica conforme a espécie e a idade dos peixes acometidos (Chang *et al.* 2002; Evans *et al.* 2009, Avci *et al.* 2013; Türe *et al.*, 2014). Os peixes infectados apresentam como sinais clínicos anorexia, letargia, natação errática exoftalmia, escurecimento da pele e hemorragia (Vendrell *et al.* 2006; Fukushima *et al.* 2017). Por ser uma doença sistêmica, vários órgãos, incluindo coração, rim, baço, fígado e trato gastrointestinal podem ser também afetados,

sendo observado principalmente hiperemia, hemorragia e necrose (Avci *et al.* 2013; Didinen *et al.* 2014).

O aumento no número de casos de isolamento deste patógeno em peixes produzidos no Brasil tem motivado o desenvolvimento de pesquisas para o entendimento da patogênese da doença. O primeiro relato do isolamento de *L. garvieae* em peixes no Brasil foi realizado por Evans *et al.* (2009) em exemplares de *Oreochromis niloticus* e *Pseudoplatystoma corruscans*. Posteriormente, Sebastião *et al.* (2015) reportaram o isolamento desta mesma bactéria em *O. niloticus* no estado de São Paulo durante o outono, inverno e primavera, e em *P. reticulatum* no estado de Mato Grosso do Sul durante a primavera. Neste mesmo estado, Fukushima *et al.* (2017) também relataram a ocorrência de lactococose em peixes do gênero *Pseudoplatystoma*.

Os peixes do gênero *Pseudoplatystoma*, como *P. reticulatum*, *P. corruscans* e seus híbridos, popularmente conhecidos como “surubins” são importantes economicamente para a América do Sul, em 2015 a sua produção alcançou 67,0 toneladas (Food and Agriculture Organization, 2017). Estes peixes são produzidos na Argentina, Colômbia, Venezuela, Bolívia e Brasil. No Brasil, a produção de surubim continua em expansão (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas 2016), isto se deve as características zootécnicas interessantes, como rápido crescimento (Barbosa *et al.* 2011) e rendimento de processamento satisfatório (Fantini *et al.* 2013). Devido a importância econômica de peixes do gênero *Pseudoplatystoma* spp. e o relatos do isolamento da *L. garvieae* em unidades produtoras, o surubim híbrido foi eleito como modelo experimental para o estudo dos aspectos patológicos da lactococose visando viabilizar o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção.

Com este estudo o objetivo foi avaliar as respostas hematológicas e bioquímicas assim como as alterações teciduais em juvenis de surubim híbrido *Pseudoplatystoma*

reticulatum x *Pseudoplatystoma corruscans* infectados experimentalmente com *Lactococcus garvieae*.

Material e Métodos

Bactéria

Foi utilizada a cepa 31MS de *Lactococcus garvieae* fornecida pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos - LAPOA, do Centro de Aquicultura da UNESP/CAUNESP, Jaboticabal-SP, previamente isolada de rim de cachara *Pseudoplatystoma reticulatum* com sintomatologia de lactococose. A pureza da cepa foi confirmada por meio de caracterização genética, mediante extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA segundo método proposto por Sebastião *et al.* (2015).

Animais e manejo

Juvenis de surubim híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Pseudoplatystoma corruscans* (n=72) com peso total de $21,3 \pm 5,5$ g e comprimento total de $17,1 \pm 1,3$ cm provenientes da mesma desova foram adquiridos em piscicultura comercial e transportados para o laboratório para aclimação às condições experimentais durante 15 dias. Durante o período de aclimação, os peixes foram acondicionados em caixas de polietileno (120L), com sistema de filtragem, aeração constante e controle de temperatura (26-28°C). Os peixes foram alimentados até aparente saciedade duas vezes ao dia com ração comercial extrusada para peixes carnívoros (Laguna Carnívoro Alevinos; 2,6 mm; Proteína Bruta 450 g kg^{-1} ; Extrato Etéreo 80 g kg^{-1} ; Fibra bruta 40 g kg^{-1} e matéria mineral 150 g kg^{-1}). Trocas parciais de água (25-50%) foram realizadas diariamente, sendo os restos de ração e as fezes retiradas por sifonamento. A higidez

dos animais foi confirmada por meio de exame clínico externo e comportamental, além de exame microbiológico realizado em amostras de fígado, baço, rim e encéfalo de peixes (n=6) amostrados do lote adquirido para o experimento. Durante todo o experimento, a qualidade da água foi mensurada diariamente e os valores permaneceram dentro da faixa de conforto para peixes tropicais (Campos 2013): temperatura $28,1 \pm 1,4$ °C, oxigênio dissolvido $4,9 \pm 0,8$ mg L⁻¹, pH $7,1 \pm 0,2$ e condutividade elétrica $55,9 \pm 7,9$ µS.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normativas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal/CONCEA e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS (Protocolo nº 601/2014).

Delineamento e Infecção Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, cada repetição continha 22 espécimes de surubim. Para a infecção experimental os peixes foram anestesiados em solução de eugenol (50 mg L⁻¹) até atingirem o estágio de anestesia cirúrgica e inoculados na região celomática com 0,1 mL de suspensão contendo a *L. garvieae* na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. A concentração da bactéria no inóculo foi determinada de acordo com o estudo de Fukushima *et al.* (2017) com surubim híbrido.

Antes da inoculação da suspensão bacteriana e nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias pós-inoculação (dpi), 11 peixes foram amostrados para avaliação dos sinais clínicos, parâmetros hematológicos e bioquímicos, além da colheita de baço e rins para análise histopatológica. Os peixes amostrados antes da inoculação da suspensão bacteriana constituíram o grupo controle.

Dos peixes inoculados, amostras de fígado, baço, rins e encéfalo, colhidas assepticamente foram submetidas às técnicas microbiológicas de rotina (cultura em ágar BHI e incubação por 24 horas a 35°C) para recuperação da *L. garvieae* e confirmação da infecção. A identificação das colônias foi realizada por meio da coloração de Gram, hemólise em ágar sangue e provas bioquímicas (catalase, oxidase, crescimento em McConkey, crescimento a 45°C, produção de gás e de H₂S em TSI, O/F, utilização de citrato, ureia, indol e motilidade).

Análise hematológica

Para a determinação dos parâmetros hematológicos os peixes foram anestesiados em solução de eugenol (50 mg L⁻¹) e o sangue foi colhido por punção caudal, utilizando seringas e agulhas banhadas em EDTA 3%. Foram determinados hematócrito pelo método de microhematócrito, hemoglobina pelo método de cianometahemoglobina, número de eritrócitos em câmara de Neubauer após a diluição do sangue em solução de formol citrato (1:200, v/v) e índices hematimétricos, compreendidos pelo volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Em extensões sanguíneas coradas pancromicamente com May-Grüwald-Giemsa-Wright foi realizada a contagem diferencial de leucócitos (monócitos, linfócitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos e leucócito granular PAS positivo LG-PAS) de acordo com método proposto por Ranzani-Paiva *et al.* (2013).

Análise bioquímica

A glicose sanguínea foi determinada em glicosímetro portátil (*Accu-Chek Active; Roche Diagnostics*®) imediatamente após a colheita do sangue. Para a determinação dos valores plasmáticos de ureia, proteína total e albumina, o plasma foi

obtido por meio da centrifugação do sangue e congelado a -20°C até o momento da realização das análises. O valor de globulina foi obtido pela subtração do valor de proteína total e de albumina. As análises foram realizadas em sistema automatizado utilizando analisador COBAS C111 SYSTEM (Roche Instrument Center – Suíça).

Análise macroscópica, índices somáticos e histopatologia

Os peixes foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico em solução de eugenol na concentração de 450 mg L^{-1} (American Veterinary Medical Association 2013), seguido de secção medular e necropsiados para a exposição dos órgãos e registro das possíveis alterações/lesões macroscópicas.

O baço foi colhido e pesado em balança analítica, para determinação do índice e índice esplenossomático IES (%) (peso do baço, g / peso do peixe, g) $\times 100$ e, posteriormente, fixado juntamente com os rins em solução de formol tamponado 10% (pH 7,2) durante 24 horas. Fragmentos dos órgãos foram processados para inclusão em Paraplast® (Sigma-Aldrich). Secções de $3\text{ }\mu\text{m}$ de espessura foram coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

As alterações histopatológicas foram analisadas por meio do sistema de escore semi-quantitativo adaptado de Bernet *et al.* (1999), considerando as alterações quanto ao padrão de reação tecidual (adaptativa, circulatória, regressiva e inflamatória), escore de distribuição (focal=2, focal extensa a multifocal=4 e difusa=6) e grau de importância. Para o cálculo do índice de alteração histopatológica (IAH) utilizou-se a seguinte fórmula: $\text{IAH} = \sum_{\text{pr}} \sum_{\text{alt}} (a_{\text{org pr alt}} \times w_{\text{org pr alt}})$, onde: org=órgão, pr=padrão de reação, alt=alteração, a= escore de distribuição e w=fator de importância. Este índice representa o grau de dano ao órgão e é obtido a partir do somatório da multiplicação do grau de

importância e os escores de distribuição de todas as alterações observadas no órgão examinado.

Análise estatística

Os dados dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e dos índices somáticos de cada tempo pós-inoculação foram comparados individualmente com o grupo controle, utilizando o teste de Mann-Whitney. Os índices de alteração histopatológica foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para comparação entre os tempos pós-inoculação. Para todas as análises adotou-se o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no software estatístico GraphPad Prism versão 5.0, San Diego, Califórnia-USA.

Resultados

Não houve registro de mortalidade nos peixes inoculados e à partir de 3 dpi surgiram os primeiros sinais clínicos. Em 10,6% (7/66) dos peixes inoculados foram observados pontos hemorrágicos nos opérculos (Fig. 1A) e região ventral (Fig. 1B) aos 3, 14 e 21dpi, hemorragia bucal (Fig. 1C) e hiperemia na região ventral aos 7dpi e hiperemia nas nadadeiras pélvicas aos 14dpi. Os demais animais (89,4%; 59/66) não apresentaram quaisquer sinais clínicos.

As culturas bacterianas dos rins e fígado dos peixes inoculados obtidas aos 1 e 3 dpi foram identificadas como *L. garvieae*. Estes isolados apresentaram-se morfologicamente como cocos gram-positivos, organizados em cadeias curtas, não móveis, α -hemolíticos, fermentativos (glicose e lactose), não produtores de catalase,

oxidase, indol, gás e H₂S. Não utilizadores de citrato e ureia. O crescimento foi negativo em Mc Conkey e positivo em BHI 45°C.

O hematócrito reduziu ($P < 0,05$) aos 1, 3 e 14 dpi, enquanto que a hemoglobina e o número de eritrócitos reduziram ($P < 0,05$) aos 3, 14 e 21 dpi. Os valores dos índices hematimétricos dos peixes inoculados com *L. garvieae* não diferiram ($P > 0,05$) dos peixes do grupo controle (Tabela 1).

No leucograma observamos que os valores de monócitos permaneceram estáveis até 3 dpi, com subsequente redução ($P < 0,05$) aos 7, 14 e 21 dpi (Fig. 2A). Linfócitos diminuíram aos 21 dpi (Fig. 2B), enquanto que os neutrófilos aumentaram ($P < 0,05$) aos 3, 7 e 21 dpi (Fig. 2C). Os valores de basófilos, eosinófilos e de leucócitos granulares PAS positivos (LG-PAS) não foram influenciados ($P > 0,05$) pela infecção (Figs. 2D, 2E, 2F).

Aos 3 dpi os peixes apresentaram glicemia menor ($P < 0,05$) em relação aos peixes do grupo controle. Os valores de ureia dos peixes infectados permaneceram semelhantes ($P > 0,05$) aos dos peixes do grupo controle durante todo o período analisado. Por outro lado, houve redução ($P < 0,05$) de proteína total e de globulina aos 14 dpi (Tabela 2).

À necropsia não foram observadas alterações macroscópicas no baço (Fig. 3A) e rim cefálico e exócrino (Fig. 4A) dos peixes do grupo controle. Nos peixes inoculados a partir de 3 dpi observou-se intensa hiperemia no baço (Fig. 3B) e também no rim cefálico que apresentou consistência friável. Aos 7 dpi observou-se baço com bordas irregulares e translúcidas (Fig. 3C) e rim exócrino pálido com áreas de hemorragia (Fig. 4B e 4C). Aos 14 e aos 21 dpi o baço apresentou superfície granulosa (Fig. 3D) e os rins continuaram pálidos, porém apresentando áreas hemorrágicas mais extensas (Fig.

4D). O índice esplenossomático dos peixes inoculados diminuiu ($P < 0,05$) aos 7 dpi (0,08%), 14 dpi (0,07%) e 21 dpi (0,08%) em relação ao peixes do controle (0,11%).

O índice de alteração histopatológica (IAH) do baço aos 7 e 14 dpi foi superior ($P < 0,05$) em relação aos 1 e 3 dpi, e semelhante aos 21dpi (Fig. 5A). No baço ocorreram principalmente hiperemia focal e hemorragia com distribuição variando de multifocal a difusa (Fig. 6B E 6C). Necrose focal e difusa com formação granulomatosa contendo melanomacrófagos no seu interior foram observados a partir de 7 dpi (Fig. 6D e 6E). Centros de melanomacrófagos (CMM's) foram observados em todos os períodos de amostragem, porém a partir de 3 dpi aumentaram em quantidade e em tamanho (Fig. 6E e 6F).

No rim cefálico o IAH não diferiu entre os períodos ($P > 0,05$; Fig. 5B). Hiperemia e hemorragia multifocal, infiltrado neutrofílico e mononuclear multifocal e perivascular, assim como necrose de liquefação com distribuição variando de multifocal a difusa foram as alterações mais prevalentes entre 3 e 14 dpi. O IAH do rim exócrino não diferiu entre 3, 7, 14 e 21 dpi, porém foi superior ($P < 0,05$) à 1dpi (Fig. 5C). No rim exócrino a resposta foi caracterizada por hiperemia (1 dpi) e hemorragia com distribuição multifocal (Figs. 7B), degeneração vacuolar do epitélio tubular, necrose focal nos túbulos e interstício, especialmente na região cranial do tecido renal (Fig. 7C e 7D), infiltrado neutrofílico multifocal no interstício (Fig. 7E e 7F), além da ocorrência de necrose glomerular (Figs. 7D e 7F), hipertrofia glomerular com hialinização do espaço de Bowman (Fig. 7G). Aos 14 e 21 dpi foram observados depósitos multifocais de cálcio no interstício e lúmen tubular, além de túbulos em processo de neogênese (Fig. 7H).

Discussão

As alterações hematológicas, bioquímicas bem como as lesões nos órgãos estudados indicam que *L. garvieae* é patogênica para o surubim híbrido. A infecção embora não seja letal, compromete o funcionamento adequado do sistema imune inespecífico do peixe devido a redução da quantidade das principais células envolvidas no processo de defesa do organismo decorrente das lesões nos órgãos hematopoiéticos.

A baixa taxa de morbidade e ausência de mortalidade podem estar relacionadas às características inerentes à cepa, ao hospedeiro, assim como das características ambientais. A patogênese da lactococose pode variar acordo com características fenotípicas da cepa, a espécie e idade do peixe, e características da qualidade da água de cultivo, principalmente temperatura (Vendrell *et al.* 2006; Tsai *et al.* 2012). Do ponto de vista fenotípico, a virulência da *L. garvieae* está relacionada presença de uma cápsula de exopolissacarídeo (EPS). Altas taxas de morbidade e mortalidade estão associadas às infecções causadas pelas cepas encapsuladas. A presença da cápsula dificulta o processo de opsonização reduzindo a eficiência da fagocitose pelos leucócitos e assim possibilitando o desenvolvimento da doença (Yoshida *et al.* 1997). Por outro lado, as cepas desprovidas de cápsula são consideradas menos virulentas, pois ocasionam sinais clínicos discretos, taxas de mortalidade baixas ou ausência de mortalidade (Barnes *et al.* 2002; Kang *et al.* 2004; Vendrell *et al.* 2006; Tsai *et al.* 2012).

Os parâmetros hematológicos podem ser importantes ferramentas no diagnóstico e prognóstico de doenças bacterianas em peixes. A redução dos valores de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos dos peixes inoculados aos 3, 14 e 21 dpi pode ser resultante da lise dos eritrócitos devido atividade hemolítica de toxinas produzidas pela *L. garvieae*, ou ainda devido a lesão vascular (Kusuda & Hamaguchi 1988; Clauss, Dove & Arnold 2008). Estes achados são corroborados pela análise macroscópica pós-

necropsia tais como hemorragia na região ventral e na cavidade bucal, além de pontos hemorrágicos nos órgãos. A redução dos parâmetros do eritrograma pode indicar condição anêmica e também já foi relatada para *Oncorhynchus mykiss* (Avsever *et al.* 2014) e *P. reticulatum* x *P. corruscans* (Fukushima *et al.* 2017) com lactococose. Alterações nos parâmetros do eritrograma é uma resposta comum a infecções bacterianas causadas por outros agentes etiológicos como *Aeromonas* spp. (Řehulka, 2002; Garcia & Moraes 2009; Silva *et al.* 2012), *Mycobacterium marinum* (Ranzani-Paiva *et al.* 2004) e *Enterococcus* sp. (Martins *et al.* 2008), *Flavobacterium columnare* (Řehulka & Minařic, 2007) e *Streptococcus agalactiae* (Alsaid *et al.* 2014).

Os leucócitos são importantes células do sistema imune inespecífico, e compõe uma das principais linhas de defesa contra patógenos nos peixes, especialmente em infecções bacterianas (Uribe *et al.* 2011). A monocitopenia observada aos 7, 14 e 21 dpi e a linfopenia aos 21 dpi caracterizam um quadro de imunossupressão (Garcia & Moraes 2009; Clauss *et al.* 2008; Adeyemi *et al.* 2013). A redução nos valores de monócitos pode estar relacionada a migração destas células para os tecidos ou devido a redução na sua produção devido às alterações causadas pela *L. garvieae* nos órgãos hematopoiéticos, como rim e baço.

A neutrofilia observada nos peixes inoculados aos 3 e 7 dpi é uma típica resposta inflamatória frente a infecções bacterianas (Silva *et al.* 2012; Fukushima *et al.* 2017). Concomitante com o aumento desta célula na corrente sanguínea há migração para o foco inflamatório, devido a liberação de fatores quimiotáticos (Suzuki & Iida 1992). Nos tecidos, os neutrófilos iniciam prontamente o processo de fagocitose (Secombes 1996, Clauss *et al.* 2008). Esse processo é mais intenso nos primeiros 3 a 4 dias pós-infecção e após este período há a redução no valor dos neutrófilos (Secombes 1996). No

presente estudo, este quadro foi caracterizado aos 14 dpi quando os peixes apresentaram redução acentuada no valor dos neutrófilos.

As variações bioquímicas do plasma são indispensáveis no diagnóstico de doenças nos animais, no entanto há poucos estudos reportando as alterações do perfil bioquímico em doenças infecciosas em peixes (Řehulka 2002; Řehulka & Minařic 2007; Yu, Han & Park, 2010). A redução da glicose sanguínea observada nos peixes amostrados aos 3 dpi é um achado ainda considerado inconsistente, pois tanto a hipoglicemia (Řehulka & Minařic 2007; Yu *et al.* 2010) quanto a hiperglicemia podem ser observadas em peixes com infecção bacteriana (Martins *et al.* 2008; Alsaid *et al.* 2014). A redução da proteína plasmática total e globulina aos 14 dpi sugere a perda de proteína devido a hemorragia observada no tecido renal dos peixes. A hipoproteinemia é uma alteração comumente observada em peixes acometidos por bactérias que causam lesão vascular e/ou lesão de tecido muscular, como *Aeromonas* spp. (Řehulka 2002; Garcia & Moraes 2009) e *Flavobacterium columnare* (Řehulka & Minařic 2007).

Baço e rins foram os principais tecidos afetados pela lactococose. As alterações circulatórias como hiperemia e hemorragia que foram evidenciadas nestes órgãos são comuns em peixes com infecção por *L. garvieae* (Pereira *et al.* 2004; Vendrell *et al.* 2006; Aguado-Urda *et al.* 2014; Avci *et al.* 2013). A hiperemia é uma manifestação característica da reação inflamatória aguda (Suzuki & Iida, 1992), enquanto que a hemorragia é decorrente de dano vascular ocasionado pelas toxinas bacterianas (Avci *et al.* 2013).

A ocorrência de necrose no baço podem ter ocasionado a redução do índice esplênossomático aos 7, 14 e 21 dpi. No rim cefálico as áreas de necrose foram observadas na maioria das amostras avaliadas, porém, em alguns casos foi observado necrose liquefativa, decorrente da presença massiva de neutrófilos, bactérias e debris

celulares. As enzimas extracelulares dos neutrófilos podem ocasionar danos ao tecido do hospedeiro contribuindo para a sua liquefação (Secombes 1996). Este tipo de alteração é comumente observado durante infecções bacterianas (Ferguson 2006).

As bactérias do gênero *Streptococcus* apresentam forte tropismo pelo tecido renal. Além disso, este tecido tem importante participação na remoção das bactérias do organismo do peixe (Avci *et al.* 2013). As alterações observadas nos rins foram decorrentes da ação citotóxica das toxinas da bactéria e também foram reportadas para outras espécies de peixes com lactococose (Chen *et al.* 2012; Avci *et al.* 2013; Aguado-Urda *et al.* 2014; Didinen *et al.* 2014).

Um achado interessante neste estudo foi a presença de túbulos em processo de neogênese observado em alguns peixes aos 14 e 21 dpi, caracterizado pela presença de aglomerados de células com citoplasma basofílico. Segundo Reimschuessel & Ferguson (2006) mesmo após danos severos ao epitélio tubular, caso a membrana basal não tenha sido danificada, células epiteliais podem se dividir e migrar ao longo da membrana e repovoar o néfron, dando início ao processo regenerativo. Esse processo foi previamente descrito em outras espécies de peixes após alterações causadas por gentamicina (Augusto *et al.* 1996; Salice *et al.* 2001; Watanabe *et al.* 2009) e em truta arco íris infectadas por *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Palikova *et al.* 2017).

Embora não seja letal a cepa de *L. garvieae* utilizada é patogênica para o surubim híbrido ocasionando anemia, hipoproteïnemia e imunossupressão o que compromete a homeostasia dos peixes. Além disso, baço, rim exócrino e cefálico são os órgãos mais afetados pela lactococose, e as alterações circulatórias e regressivas observadas, tais como hiperemia, hemorragia, necrose liquefativa podem comprometer a hematopoiese levando à redução na imunocompetência dos peixes.

Referências

- Adeyemi J.A., Atere T.G., Oyedara O.O. & Olabiyi K.O. (2013) Hematological assessment of health status of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) experimentally challenged with *Escherichia coli* and *Vibrio fischeri*. *Comparative Clinical Pathology* **23**, 1309–1313.
- Aguado-Urda M., Rodríguez-Bertos A., Heras A.I., Blanco M.M., Acosta F., Cid R., Fernández-Garayzábal, J.F. & Gibello A. (2014) Experimental *Lactococcus garvieae* infection in zebrafish and first evidence of its ability to invade non-phagocytic cells. *Veterinary Microbiology* **171**, 248-254.
- Algöet M., Bayley A.E., Feist S.W., Wheeler R.W. & Verner-Jeffreys D.W. (2009) Susceptibility of selected freshwater fish species to a UK *Lactococcus garvieae* isolate. *Journal of Fish Diseases* **32**, 825–834.
- Alsaid M., Abuseliana A.F., Daud H.H., Mustapha N.M., Bejo S K., Abdelhadi Y.M. & Hamdam R.H. (2014) Haematological, Biochemical and Clinical Signs Changes Following Experimental Infection of *Streptococcus agalactiae* in Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquacultura Indonesiana* **15**, 86-93.
- American Veterinary Medical Association. (2013) *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. Schaumburg: AVMA: 2013. p.102.
- Augusto J., Smith B., Smith S., Robertson J. & Reimschuessel R. (1996) Gentamicin-induced nephrotoxicity and nephrogenesis in *Oreochromis nilotica*, a tilapia fish. *Diseases of Aquatic Organisms* **26**, 49-58.
- Avci H., Birincioglu S.S., Tanrikul T.T., Epikmen E.T., Metin N. & Avsever M.L. (2013) Experimental *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus*

mykiss, Walbaum 1792: a comparative histopathological and immunohistochemical study. *Journal of Fish Diseases* **37**, 481-495.

Avsever M.L., Tanrikul, T.T., Gürsoy D., Metin S., Akşit H. & Tunahgil S. (2014) Investigation of certain blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fisheries Sciences* **8**, 114-120

Barbosa, O.N., Raizer, J., Gonda M.F. & Silva J.M. (2011). Desempenho e coeficiente intestinal de alevinos puros e híbridos de pintados em condicionamento alimentar. *Revista Brasileira de Zootecnia* **40**, 2621-2627.

Barnes A., Guyot C., Hansen B.G., Mackenzie K., Horne M. T. & Ellis A.E. (2002) Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **12**, 155-168.

Bernet D., Schmidt H., Meier W., Burkhardt-Holm P. & Wahli T. (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* **22**, 25-34.

Campos J. L. (2013) O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829) e outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: B. Baldisserotto & L. C. Gomes, eds., *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. 2 ed. Santa Maria: Ed. Da UFSM., pp.335-361.

Castro R., Reguera-Brito M., López-Campos G.H., Blanco M.M., Aguado-Urda M., Fernández-Garayzábal J.F. & Gibello A. (2017) How does temperature influences the development of lactococcosis? Transcriptomic and immunoproteomic in vitro approaches. *Journal of Fish Diseases*. doi:10.1111/jfd.12601.

- Chang P.H., Lin C.W. & Lee Y.C. (2002) *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists* **22**, 319–326.
- Chen M-H., Hung S-W., Shyu C-L., Lin C-C., Liu P-C., Chang C-H., Shia W-Y., Cheng C-F., Lin S-L., Tu C-Y., Lin Y-H. & Wang W-S. (2012) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in Bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* x *Acipenser ruthenus*, in Taiwan. *Research in Veterinary Science* **96**, 581-588.
- Chen S-C., Lin L-D., Liaw L-L. & Wang P-C. (2001) *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Disease of Aquatic Organisms* **45**, 45-52.
- Chen S-C.; Liaw L-L., Su H-Y., Co S-C., Wu C-Y., Chaung H-C., Tsai Y-H., Yang K-L., Chen Y-C., Chen T-H., Lin G-R., Cheng S-Y., Lin Y-D., Lee J-L., Lai C-C., Weng Y-J & Chu S-Y. (2002) *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* **25**, 727-732.
- Clauss T.M., Dove A.D.M. & Arnold J.E. (2008) Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* **11**, 445-462.
- Didinen B.I., Yardimci B., Onuk E.E., Metin S. & Yildirim P. (2014) Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972): New histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *Revue de médecine vétérinaire* **165**, 12-19.
- Eldar A. & Ghittino C. (1999) *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Diseases of Aquatic Organisms* **36**, 227-231.

- Evans J.J., Klesius P.H. & Shoemaker C.A. (2009) First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *Journal of Fish Diseases* **32**, 943-951.
- Fantini, L.E., Rodrigues R.A., Nunes A.L., Sanches M.S.S., Ushizima T.T. & Campos, C.M. (2013) Rendimento de carcaça de surubins *Pseudoplatystoma* spp. produzidos em tanque rede e viveiro. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* **14**, 538-545.
- Ferguson H.W. (2006) *Systemic Pathology of Fish. A text and Atlas of normal tissues in teleosts and their responses in diseases*. Scotian Press, Leicester.
- Food and Agriculture Organization. (2017) Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Branch. Roma:FAO:2017.
- Fukuhima H.C.S., Leal C.A.G., Cavalcante R.B., Figueiredo H.C.P., Arijó S., Moriñigo M.A., Ishikawa M., Borra R.C & Ranzani-Paiva M.J.T. (2017) *Lactococcus garvieae* outbreaks in Brazilian farms Lactococcosis in *Pseudoplatystoma* sp.- development of an autogenous vaccine as a control strategy. *Journal of Fish Diseases* **40**, 263-272.
- Garcia, F. & Moraes F.R. (2009) Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* **31**, 17-21.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. (2016) Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro:IBGE: 2016.
- Kang S-h., Shin G-w., Shin Y-w., Palaska K.J., Kim Y-r., Lee E-y., Lee E-g., Huh N-e., Ju O.M & Jung H-h. (2004) Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Journal of Veterinary Sciences* **5**, 387-390.

Kav K. & Erganis O. (2008) Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. *Bulletin of Veterinary Institute of Pulawy* **52**, 223-226.

Kawanishi M., Yoshida T., Yagashiro S., Kijima M., Yagyu K., Nakai T., Murakami M., Morita H. & Suzuki S. (2006) Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 496–504.

Kusuda K. & Hamaguchi M. (1988) Extracellular and intracellular toxins of *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail. *Bulletin European Association of Fish Pathologists* **8**, 9-10.

Martins M.L., Mouriño J.L.P., Amaral G.V., Vieira F.N., Dotta G., Jatobá A.M.B., Pedrotti F.S., Jerônimo G.T. Buglione-Neto C.C. & Pereira-Jr. G. (2008) Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 657-661.

Palikova M., Papezikova I., Markova Z., Navratil S., Mares J., Mares L., Vojtek L., Hyrsal P., Jelinkova E. & Schmidt-Posthaus H. (2017) Proliferative kidney disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under intensive breeding conditions: Pathogenesis and haematological and immune parameters. *Veterinary Parasitology*, <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.003>

Pereira F., Ravelo C., Toranzo A.E. & Romald J.L. (2004) *Lactococcus garvieae*, and emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **24**, 274-279.

Ranzani-Paiva M.J.T., Ishikawa C.M., Eiras A.C. & Silveira V.R. (2004) Effects of an experimental challenge with *Mycobacteriu marinum* on the blood parameters of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **46**, 945-953.

Ranzani-Paiva M.J.T., Pádua S.B.,Tavares-Dias, M. & Egami M.I. (2013) *Métodos para análise hematológica em peixes*. Maringá: Eduem, p.135.

Řehulka, J. & Minařic, B. (2007) Blood parameters in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill, 1815), affected by columnaris disease. *Aquaculture Research* **38**, 1182-1197.

Řehulka, J. (2002) *Aeromonas* causes severe skin lesions in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haemathology and Biochemistry. *Acta Veterinaria BRNO* **71**, 351-360.

Reimschuessel R. & Ferguson H.W. (2006) Kidney In: *Systemic Pathology of Fish. A text and Atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease* (ed by H. W. Ferguson), pp.91-119. Scotian Press, Leicester

Salice C.J., Rokous J.S., Kane A.S. & Reimschuessel R. (2001) New Nephron Development in Goldfish (*Carassius auratus*) Kidneys Following Repeated Gentamicin-Induced Nephrotoxicosis. *Comparative Medicine* **51**, 56-59.

Sebastião F.A., Furlan L.R., Hashimoto, D.T. & Pilarski F. (2015) Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. *Advance in Microbiology* **5**, 409-424.

Secombes C.J. (1996) The Nonspecific Immune System: Celular Defenses. In: G. Iwama & T Nakanishi, eds., *The Fish Immune System*. London: Academic Press, pp.. 63-105.

- Silva B.C., Mouriño J.L.P., Vieira F.N., Jatobá A., Seiffert W.Q. & Martins M.L. (2012) Haemorrhagic septicemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* **42**, 908-916.
- Suzuki Y. & Iida T. (1992) Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annual Review of Fish Diseases* **2**, 149-160.
- Tsai M-A., Wang P-C., Liaw L-L., Yoshida T., Chen S-C. (2012) Comparison of genetic characteristics and pathogenicity of *Lactococcus garvieae* isolated from aquatic animals in Taiwan. *Disease of Aquatic Organisms* **102**, 43-51.
- Türe M., Haliloğlu H.I., Altuntas C., Boran H. & Kutju I. (2014) Comparison of Experimental Susceptibility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Turbot (*Psetta maxima*), Black Sea Trout (*Salmo trutta labrax*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) to *Lactococcus garvieae*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **14**, 507-513.
- Uribe C., Folch H., Enriquez R. & Moran G. (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinani Medicina* **56**, 486-503.
- Vendrell D., Balcázar J.L., Ruiz-Zarzuela I., Blas I., Gironés O. & Múzquiz J.L. (2006) *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* **29**, 177-198.
- Wang, C-Y.C., Shie, H-S., Chen S-C., Huang J-P., Hsieh I-C., Wen M-S, Lin F-C. & Wu D. (2007) *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *International Journal of Clinical Practice* **61**, 60-73.
- Watanabe N., Kato M., Suzuki N., Inoue C., Fedorova S., Hashimoto H., Maruyama S., Matsuo S. & Wakamatsu Y. (2009) Kidney regeneration through nephron neogenesis in medaka. *Development Growth & Differentiation* **51**, 135-143.

Watanabe Y., Naito T., Kikuchi K., Amari Y., Uehara Y., Isonuma H., Hisaoka T., Ioshida T., Yaginuma K., Takaya N., Daida H. & Hiramatsu K. (2011) Infective endocarditis with *Lactococcus garvieae* in Japan: a case report. *Journal of Medical Case Reports* **5**, 356-360.

Yoshida T., Endo M., Sakai M. & Inglis V. (1997) A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Diseases of Aquatic Organisms* **29**, 233-235.

Yu J.H., Han J.J. & Park S.W. (2010) Haematological and biochemical alterations in Korean catfish, *Silurus asotus*, experimentally infected with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research* **41**, 295-302.

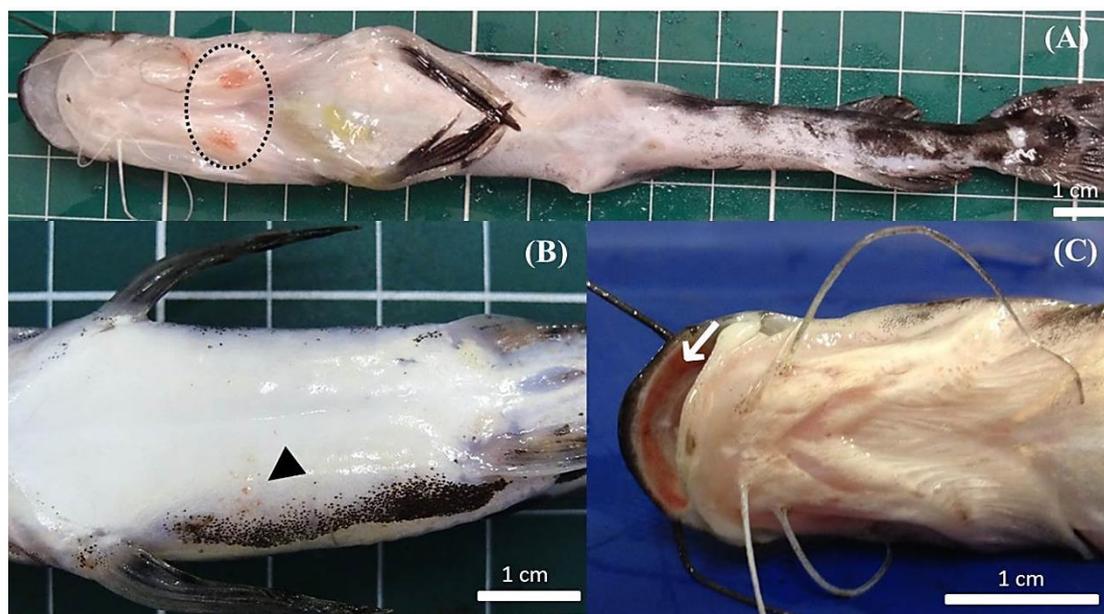


Figura 1. Alterações macroscópicas em surubim híbrido após a infecção experimental com *L. garvieae*. (A) 3 dpi; áreas de hemorragia no opérculo (círculo pontilhado) (B) 7 dpi; pontos hemorrágicos na lateral esquerda da região ventral (cabeça de seta). (C) 7 dpi; hemorragia leve na cavidade bucal (seta).

Tabela 1 Média (\pm epm) dos parâmetros do eritrograma em surubins híbridos juvenis após infecção experimental com *L. garvieae*

	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g dL ⁻¹)	Eritrócitos (x10 ⁶ µL ⁻¹)	VCM (fL)	CHCM (g dL ⁻¹)
Controle	26,7 \pm 2,1	3,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	197,5 \pm 16,9	23,8 \pm 2,1
1 dpi	21,1 \pm 1,6*	2,7 \pm 0,3	1,0 \pm 0,1	202,7 \pm 15,2	25,4 \pm 2,1
3 dpi	20,7 \pm 1,3*	2,5 \pm 0,2*	0,8 \pm 0,1*	295,9 \pm 45,5	34,8 \pm 4,3
7 dpi	22,9 \pm 1,4	2,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	239,4 \pm 16,1	27,4 \pm 1,6
14 dpi	20,1 \pm 0,9*	2,4 \pm 0,2*	0,9 \pm 0,1*	236,1 \pm 19,3	28,9 \pm 2,3
21 dpi	20,0 \pm 1,8	2,4 \pm 0,2*	0,9 \pm 0,1*	254,8 \pm 48,7	26,7 \pm 1,5

VCM: Volume corpuscular médio; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média. dpi: dias pós-inoculação. Médias com asterisco (*) diferem (P<0,05) do controle pelo teste de Mann-Whitney. epm: erro-padrão da média.

Tabela 2. Média (\pm epm) dos parâmetros bioquímicos em surubins híbridos juvenis após a infecção experimental com *L. garvieae*

	Glicose (mg dL ⁻¹)	Ureia (mg dL ⁻¹)	Proteína total (g dL ⁻¹)	Albumina (g dL ⁻¹)	Globulina (g dL ⁻¹)
Controle	37,7 \pm 3,0	17,6 \pm 1,4	2,1 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1
1 dpi	31,4 \pm 1,9	19,9 \pm 1,8	1,9 \pm 0,1	0,7 \pm 0,05	1,1 \pm 0,1
3 dpi	28,6 \pm 2,1*	16,9 \pm 2,8	1,9 \pm 0,1	0,7 \pm 0,05	1,2 \pm 0,2
7 dpi	37,5 \pm 4,10	14,8 \pm 1,1	1,8 \pm 0,1	0,7 \pm 0,04	1,1 \pm 0,1
14 dpi	32,3 \pm 3,6	17,6 \pm 2,8	1,4 \pm 0,2*	0,5 \pm 0,06	0,8 \pm 0,2*
21 dpi	49,5 \pm 5,7	12,3 \pm 2,1	2,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,02	1,4 \pm 0,1

dpi: dias pós-inoculação. Médias com asterisco (*) diferem (P<0,05) do controle pelo teste de Mann-Whitney. epm: erro-padrão da média.

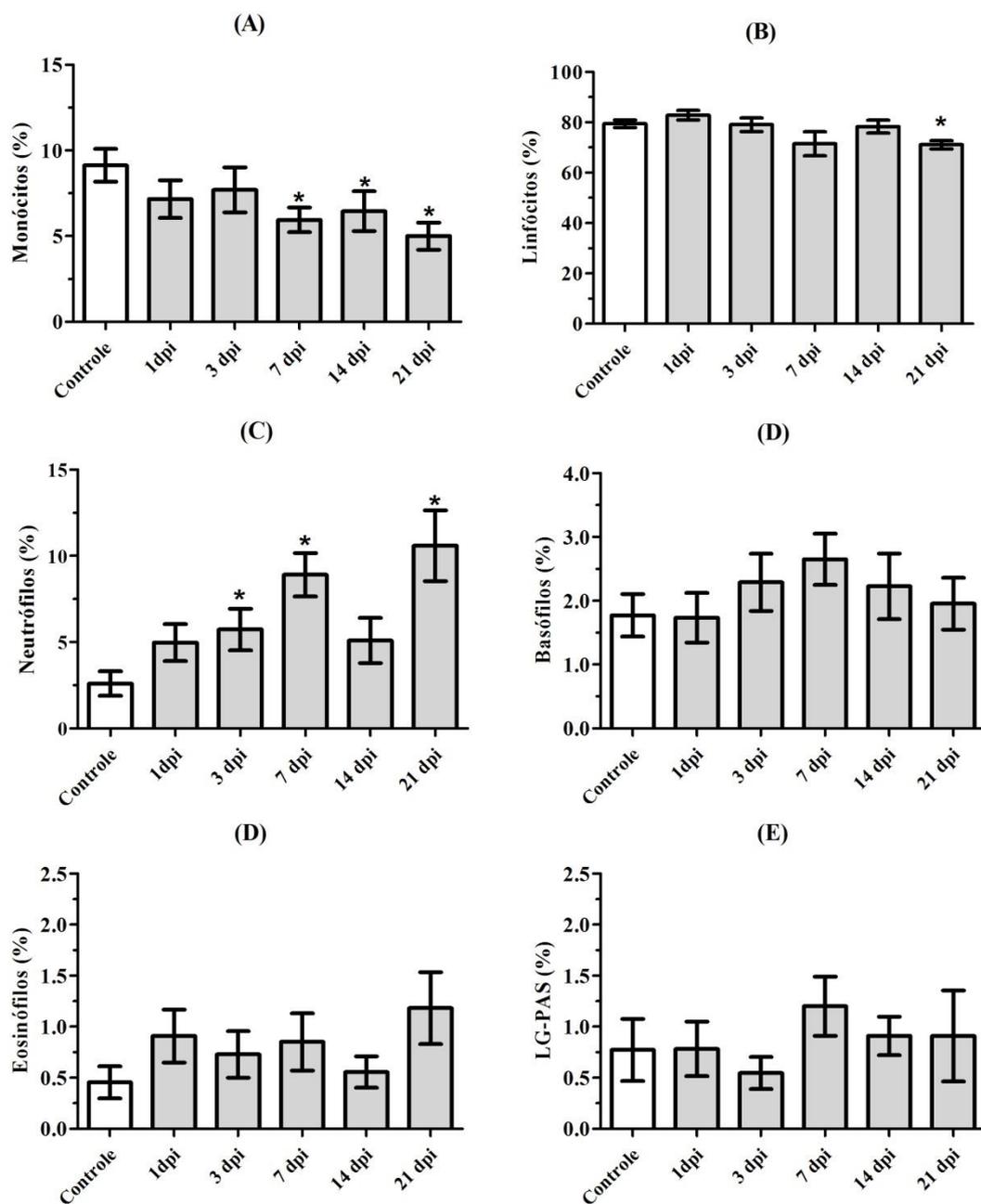


Figura 2 Percentual de leucócitos (média \pm epm) de juvenis de surubim híbrido após a infecção experimental com *L. garvieae*. Colunas com asterisco (*) diferem ($P < 0,05$) do controle pelo teste de Mann-Whitney. dpi: dias pós-inoculação; epm: Erro padrão da média.

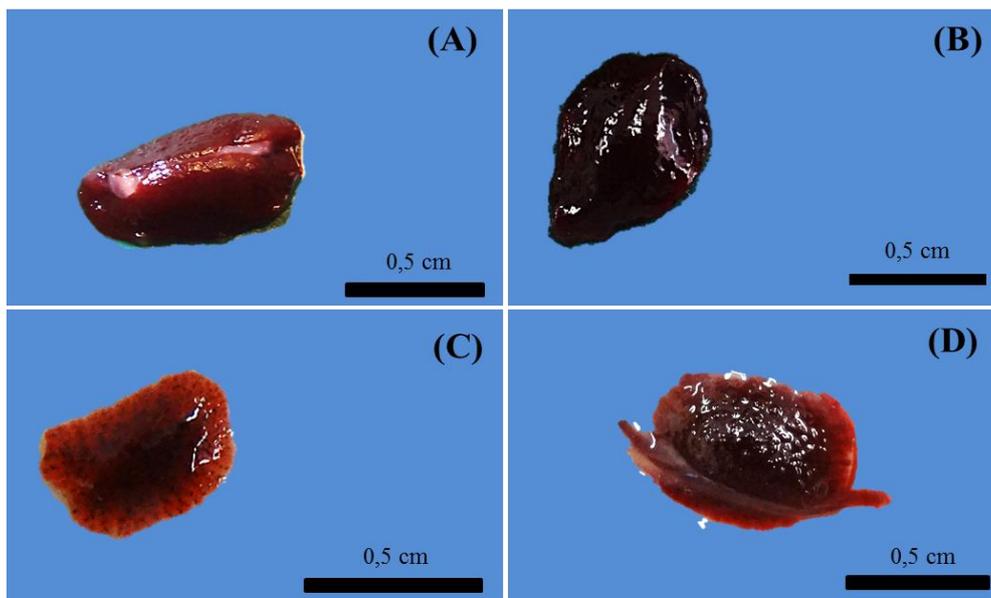


Figura 3. Alterações macroscópicas em baço de surubim híbrido após a infecção experimental com *L. garvieae*. (A) Controle; tecido esplênico com tamanho, coloração e contornos normais. (B) 3dpi; baço hiperêmico e tamanho aumentado. (C) 7dpi; baço com periferia translúcida e pontos hemorrágicos. (D) 21 dpi; baço com periferia translúcida e aspecto granuloso.

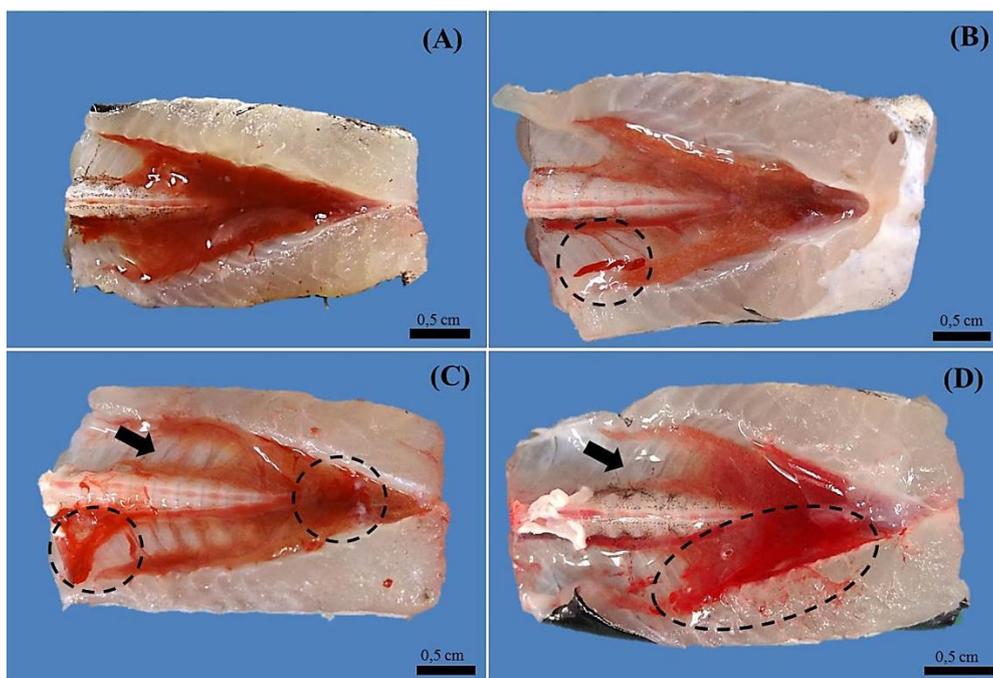


Figura 4. Alterações macroscópicas no rim exócrino de surubim híbrido após a infecção experimental com *L. garvieae*. (A) Controle; tecido com aspecto normal. (B) e (C) 7 dpi; nota-se palidez do órgão, redução da área do tecido (seta) e áreas de hemorragia (círculo pontilhado). (D) 21 dpi; Observa-se redução da área tecidual (seta) e hemorragia difusa (círculo pontilhado).

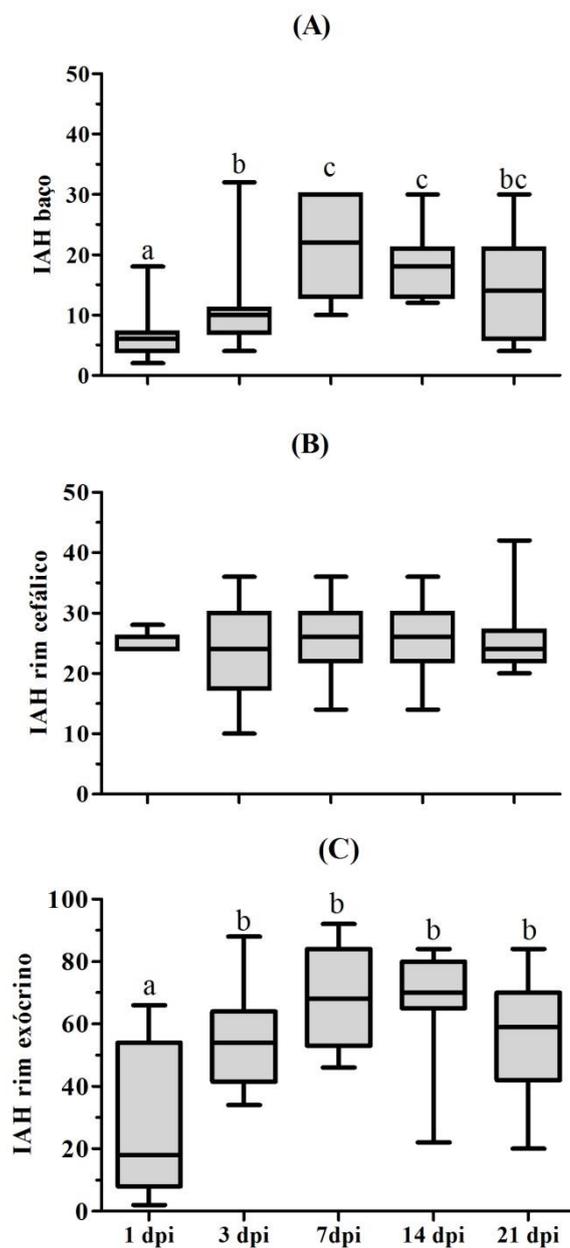


Figura 5. Mediana (25°-75° percentis) do índice de alteração histopatológica (IAH) de baço (A), rim cefálico (B) e rim exócrino (C) de surubim híbrido após a infecção experimental com *L. garvieae*. Colunas com letras distintas (a,b,c) diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney. dpi: dias pós-inoculação;

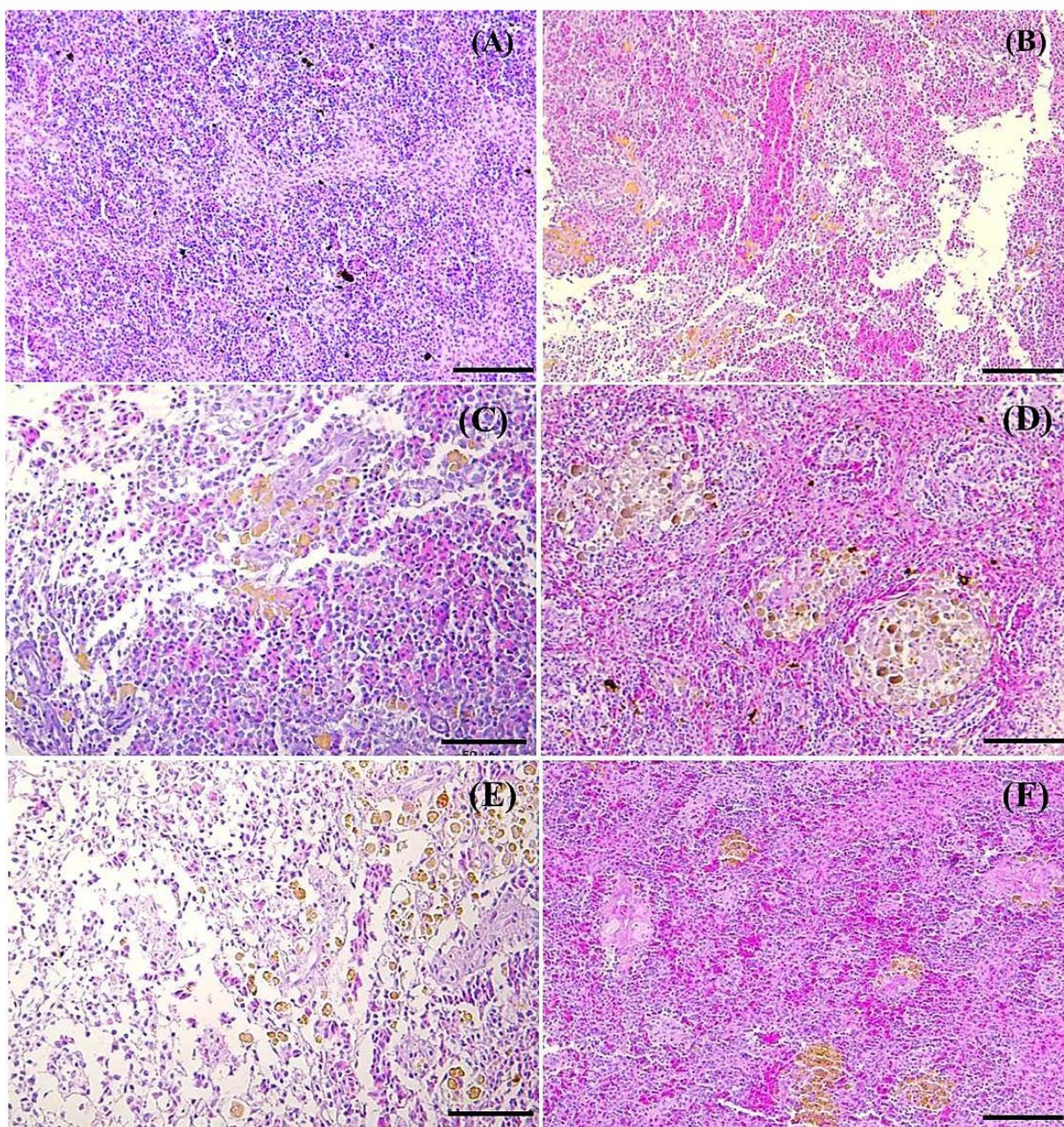


Figura 6. Secções histológicas do baço de surubim híbrido juvenil após infecção experimental com *L. garvieae*. (A) Controle; Polpa vermelha e polpa branca evidentes e presença de pequenos melanomacrófagos; H&E, barra de escala = 100 μm , 200X. (B) 3 dpi; áreas de edema, hemorragia multifocal e processo necrótico inicial; H&E, barra de escala = 100 μm , 200X. (C) 3 dpi; área de necrose com infiltrado inflamatório contendo macrófagos e neutrófilos; H&E, barra de escala = 100 μm , 200X. (D) 7 dpi, processo de formação de granuloma com a presença de melanomacrófagos; H&E, barra de escala = 100 μm , 200X. (E) 7 dpi; detalhe da área de necrose com a presença de melanomacrófagos, polpa branca e polpa vermelha não são evidentes; H&E, barra de escala = 50 μm , 400X. (F) 21dpi, hemorragia multifocal, necrose focal e presença de grandes centros de melanomacrófagos, barra de escala = 100 μm , 200X.

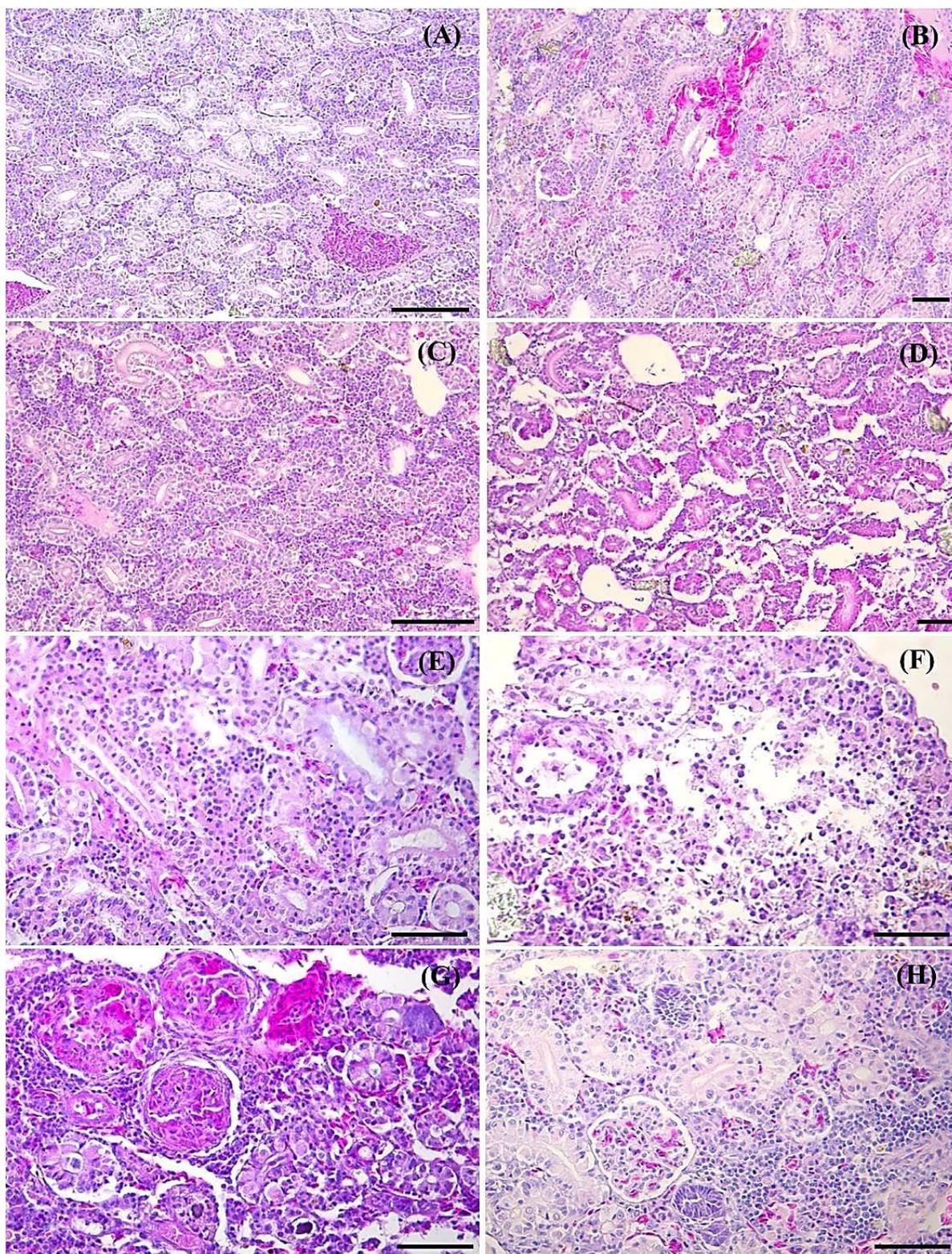


Figura 7. Secções histológicas do rim exócrino de surubim híbrido após infecção experimental com *L. garvieae*. (A) Controle; histoarquitetura renal preservada, H&E, barra de escala = 100 μ m, 200X. (B) 1 dpi; hiperemia moderada na periferia dos túbulos. Hemorragia focal intensa no centro da imagem, H&E, barra de escala = 50 μ m, 200X. (C) 3 dpi; túbulos em processo degenerativo. Em alguns notam-se inclusões hialinas nas células epiteliais e necrose tubular; H&E, barra de escala = 50 μ m, 400X. (D) 7 dpi, necrose tubular e glomerular severas e do tecido hematopoiético, barra de escala = 50 μ m,

200X. (E) 14 dpi; infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico. H&E, barra de escala = 50 μm , 400X. (F) 14 dpi; área de necrose severa no tecido hematopoiético. Infiltrado inflamatório formado por macrófagos e neutrófilos; H&E, barra de escala = 50 μm , 400X. (G) 21 dpi; hipertrofia glomerular com hialinização do espaço de Bowman; H&E, barra de escala = 50 μm , 400X. (H) 21 dpi; túbulos em processo de neogênese e formação tecidual linfopoiética caracterizado pelo aglomerado de células basofílicas; H&E, barra de escala = 50 μm , 400X.

ARTIGO II

Histologia e Histomorfometria do fígado em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Pseudoplatystoma corruscans*) produzidos em piscicultura intensiva²

Resumo

Este estudo teve como objetivo caracterizar a histologia e histomorfometria hepática em surubim híbrido de diferentes categorias (berçário, crescimento e terminação) produzido em piscicultura. As categorias foram definidas considerando o peso corporal (PC): categoria de berçário (n = 5): PC = 37,06 ± 6,00 g (31,6 - 45,3 g); categoria de crescimento (n = 5): PC = 310,40 ± 53,80 g (242,1 - 376,4 g) e categoria de terminação (n = 5): PC = 874,28 ± 27,59 g (846,2 - 913,1 g). Fragmentos de fígado foram processados para inclusão em parafina e as cortes corados em hematoxilina e eosina (H&E), PAS (Ácido Periódico de Schiff) e coloração de Perls e utilizados para histologia, histomorfometria e densidade volumétrica das estruturas hepáticas; análise de glicogênio e detecção de ferro férrico (Fe³⁺), respectivamente. O índice hepatossomático diminuiu entre as categorias (P <0,01). A porcentagem de hepatócitos PAS-positivos na categoria de berçário foi maior (P <0,05) em relação às categorias de crescimento e terminação. Os hepatócitos de todos os peixes foram positivos à coloração de Perls. A densidade volumétrica das estruturas hepáticas não diferiu entre as categorias, exceto para o percentual de veias, que foi maior (P <0,01) no berçário e crescimento. A área (μm²) e o perímetro (μm) dos hepatócitos e a área (μm²), perímetro (μm) e volume (μm³) dos núcleos nos peixes de terminação foram menores (P <0,01) do que das categorias de berçário e crescimento. Alterações nas características

² Artigo Publicado na Revista Aquaculture Research (Em anexo).

Rodrigues R.A., Saturnino K.C. & Fernandes C.E. (2017). Liver histology and histomorphometry in hybrid sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *Pseudoplatystoma corruscans*) reared on intensive fish farming. *Aquaculture Research*, doi:10.1111/are.13325.

morfométricas dos hepatócitos podem ser resultantes de alterações metabólicas associadas ao crescimento corporal dos surubins, portanto, essas características morfométricas do tecido hepático podem ser utilizadas como biomarcadores funcionais para a avaliação da saúde e estado nutricional dos peixes.

Palavras-chaves: biomarcadores funcionais, estereologia, hepatócitos, tecido hepático,

Introdução

O fígado é o maior órgão visceral em peixes e desempenha um papel central no organismo. As principais funções estão relacionadas ao metabolismo nutricional, armazenamento de glicogênio e lipídeos, síntese e regulação de moléculas endógenas e um eficiente sistema de excreção via biliar (Hinton, Segner & Braunbeck, 2001; Genten, Terwinghe & Danguy 2009).

A morfologia do tecido hepático pode ser utilizada como indicador do estado nutricional dos peixes (Rašković, Stanković, Marković & Poleskić, 2011). Qualidade da dieta, frequência alimentar e a privação de alimentos podem causar alterações importantes no parênquima hepático (Gisbert, Ortiz-Delgado e Sarasquete, 2008; Bolla, Nicolaisen & Amin, 2011). Por exemplo, em peixes submetidos a privação alimentar, tanto a área do núcleo como a área dos hepatócitos podem diminuir (Strüssmann & Takashima, 1990, Power, Melo & Santos, 2000; Rios, Donatti, Fernandes, Kalinin & Rantin, 2007). Por outro lado, em peixes superalimentados observa-se aumento no tamanho dos hepatócitos e deslocamento do núcleo para a periferia da célula devido ao acúmulo de lipídeos no citoplasma (Taddese, Huh, Bai & Vijverberg, 2014). Neste contexto, o fígado tem sido um órgão alvo em muitos estudos nutricionais em peixes de produção (Bolla et al., 2011; Ostaszewska, Dabrowski, Kwasek, Verri, Kamaszewski, Sliwinski & Napora-Rutkowski, 2011, Rašković, Čičovački, Ćirić, Marković & Poleksić, 2015).

A morfogênese do fígado envolve uma série de alterações e adaptações celulares em cada estágio de desenvolvimento que pode ser dividido em duas fases: brotação e crescimento. Na fase de crescimento, o fígado muda drasticamente de forma e volume, tornando-se alongado em relação à cavidade abdominal (Field, Ober, Roesé & Stainer 2003). O fígado de larvas de peixe durante a fase de alimentação endógena, os hepatócitos tornam-se esféricos com núcleos basofílicos centrais e citoplasma homogêneo ligeiramente eosinofílico (Gisbert, Moreira, Castro-Ruiz, Öztürk, Fernández, Gilles, Nuñez, Duponchelle, Tello, Renno, García-Dávila & Darias 2014). Após o início da alimentação exógena, os hepatócitos aumentam em tamanho e número, atingindo forma poliédrica e mais eosinofílico, e dispostos entre sinusóides, muitas vezes em torno de uma veia central (Deplano, Diaz, Cones, Kentouri Divanach e Cavalier 1991; , Mani-Ponset, Guyot & amp; Connes 1998, Gisbert *et al.*, 2014). Estes aspectos são interessantes na piscicultura, principalmente com relação à adequação do plano nutricional para melhorar a eficiência do ganho de peso. Assim, o fígado pode ser um biomarcador para efeitos nutricionais de diferentes regimes alimentares e de composição dietética, porque as reservas de energia hepática respondem de forma sensível e rápida às mudanças nutricionais. O desenvolvimento histológico do fígado tem sido utilizado como biomarcador na avaliação do estado nutricional dos peixes. Esse conhecimento é necessário para adaptar a qualidade e quantidade da dieta e as práticas de manejo ao estágio de desenvolvimento dos peixes (Gisbert *et al.*, 2014).

Os padrões morfológicos do tecido hepático de peixes de água doce em condições de cultivo foram mais estudados durante a fase larval e pouco investigados em estágios avançados de desenvolvimento (Fishelson *et al.*, 2008; Gisbert *et al.*, 2014) Becker 2001, Taddese *et al.*, 2014). Em condições de cultivo, os peixes são submetidos a modificações de dieta que oferecem diferentes níveis de proteínas, energia e

carboidratos de acordo com a fase de crescimento e as condições de produção (NRC, 2011). Isto pode implicar em adaptações subsequentes nos hepatócitos envolvendo variações nas características estruturais. Para confirmar isso, as técnicas histoquímicas, histométricas e histológicas clássicas são úteis para comparações morfológicas nos estágios de desenvolvimento e também para quantificar estruturas teciduais (Fishelson & Becker 2001, Gisbert *et al.*, 2014). A utilização dessas análises reduz a variância nas medidas quantitativas, permitindo a detecção de diferenças mínimas nas células e nos tecidos, e favorece a análise qualitativa (Hamilton & Allen, 1995, Oberholzer, Östreicher, Christen & Brühlmann, 1996). Contudo, é necessário conhecimento prévio sobre a arquitetura normal e disposição das estruturas dos tecidos. Em muitas espécies de peixes, os detalhes histológicos e histométricos das estruturas hepáticas são bem conhecidos (Hinton, Hampton & Lantz 1985, Rocha, Monteiro & Pereira, 1997). Para os peixes brasileiros, os estudos foram limitados à descrição morfológica qualitativa (Vicentini, Franceschini-Vicentini, Bombonato, Bertolucci, Lima & Santos 2005; Bombonato, Rochel, Vicentini & Vicentini 2007; Costa, Ortis, Lima, Casals, Lima & Kfoury Jr 2012), embora alguns tenham investigado as medidas histométricas e os efeitos de suplementos nutricionais, aditivos alimentares e poluentes na histologia hepática (Pádua, Urbinati, Nakaghi, Carneiro & Malheiros 2000, Honorato, Ushizima, Quintana, Campos, Marcondes, Santamaria Pereira, Alves, Alves, Senhorini, Rocha, Scaliza, Pitol & Caetano 2014).

O surubim híbrido, ou surubim, é um peixe do gênero *Pseudoplatystoma* obtidos a partir do cruzamento da fêmea de *P. reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann 1889) e do macho de *P. corruscans* (Spix & Agassiz 1829). A produção deste peixe está se expandindo dentro do Brasil, especialmente na região Centro-Oeste (IBGE, 2015), devido ao seu rápido crescimento, eficiente taxa de conversão alimentar, ao rendimento

de carcaça e à ausência de espinhos intramusculares (Scorvo-Filho, Romagosa, Ayroza & Frascá-Scorvo 2008, Liranço, Romagosa & Scorvo-Filho 2011, Fantini, Rodrigues, Nunes, Sanchez, Ushizima & Campos, 2013).

Os objetivos deste estudo foram caracterizar o tecido hepático e determinar as diferenças morfométricas nos hepatócitos de surubim híbridos entre estágios de crescimento produzidos em piscicultura intensiva.

Material e métodos

Procedimentos éticos

Todos os procedimentos seguiram princípios éticos rígidos previstos pelo CEUA (Comitê de Ética em Experimentação Animal) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocolo nº 601/2014).

Animais e manejo

Quinze espécimes de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *P. corruscans*) obtidos de piscicultura em sistema intensivo (Terenos, MS, Brasil). Os peixes foram divididos em três categorias de acordo com o peso corporal (g) e o comprimento total (cm): berçário ($n = 5$), $37,1 \pm 6,00$ g ($31,6 - 45,3$ g) e $18,5 \pm 1,22$ cm; crescimento ($n = 5$), $310,4 \pm 53,8$ g ($242,1 - 376,4$ g) e $35,5 \pm 2,48$ cm; e terminação ($n = 5$), $874,3 \pm 27,6$ g ($846,2 - 913,1$ g) e $49,5 \pm 2,21$ cm. Os peixes da categoria de berçário eram mantidos tanques com capacidade de 1000L em fluxo contínuo de água e os peixes das categorias de crescimento e terminação eram mantidas em *raceways* (10 x 5 x 1,5 m). Os peixes de categoria de berçário foram alimentados com dietas comerciais

para peixes carnívoros (SUPRA Aqua Line Juvenil, 42% de proteína bruta, 8% extrato etéreo, 4% de fibra bruta, 14% de cinzas e 32% de carboidratos ou extrativo não nitrogenado). Os peixes de crescimento e terminação foram alimentados com dietas comerciais para peixes carnívoros (SUPRA Aqua Line carnívora 40; 40% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo, 5% de fibra bruta, 13% de cinzas e 34% de carboidratos). Os peixes da fase de berçário foram alimentados *ad libitum* à noite (cerca de dez vezes). Os peixes da categoria de crescimento foram alimentados duas vezes ao dia a 2% da massa corporal. Os peixes na categoria de crescimento foram alimentados uma vez por dia a 2% da massa corporal.

Colheita do fígado, histologia e densidade volumétrica

Os peixes foram eutanasiados em solução de eugenol (450 mg L^{-1}) antes da secção medular (AMVA 2013). Em seguida, os peixes foram necropsiados e o fígado foi pesado para determinar o índice hepatossomático (IH (%)) = peso do fígado (g)/peso corporal (g)×100).

As amostras de fígado foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10%. As porções médias de fragmentos de fígado foram processadas para inclusão em parafina. Secções de 3-5 μm foram coradas pela hematoxilina e eosina (H&E) para histologia, histomorfometria e densidade volumétrica. Utilizou-se PAS (Acido Periódico Schiff) para a análise de glicogênio, e a coloração de Perls para a detecção de ferro férrico (Fe^{3+}) no tecido hepático (Carson & Hladik 2009). As análises foram realizadas em microscopia de campo claro.

A análise da densidade volumétrica do fígado foi realizada por meio do método de contagem de pontos. Dez imagens no aumento de 400x (Leica DM5500 B) foram

sobrepostas por gradículas digitais com 300 intersecções. Subseqüentemente, os hepatócitos, o espaço sinusoidal, o ducto biliar (lúmen e parede), veias, artérias e centros melanomacrófagos (MMCs) foram estimados pela fórmula:

$Dv (\%) = (Ps \times 100) / Pr$ onde Ps é o número de intersecções contadas para cada estrutura e Pr é o número total de intersecções (Freere & Weibel, 1967, Reid 1980, Rocha *et al.*, 1997). Determinou-se o percentual de hepatócitos PAS-positivo e Perls-positivo com a mesma fórmula mencionada anteriormente para a densidade volumétrica do fígado. O *software* ImageJ (versão 2.03) foi utilizado para realizar as análises (Abràmoff, Magalhães & Ram 2004).

Histomorfometria dos hepatócitos

Para a histomorfometria dos hepatócitos foi utilizado sistema de câmara digital (Leica DF495) acoplada a um microscópio (Leica DM5500 B). A histomorfometria digital foi obtida a partir de cinco imagens capturadas aleatoriamente a partir de cortes histológicos com ampliação de 1000x. A área (μm^2) e perímetro (μm) dos hepatócitos e a área (μm^2), perímetro (μm), e o diâmetro (μm) dos núcleos dos hepatócitos foram estimados em 50 células selecionadas aleatoriamente por peixe. Além disso, foram calculados os seguintes parâmetros: a relação área do núcleo/área do citoplasma ($R_{anc} = \text{área de núcleo} / \text{área citoplasma} \times 100$), o núcleo/citoplasma perímetro proporção ($R_{pnc} = \text{perímetro do núcleo} / \text{perímetro do citoplasma} \times 100$), e o volume do núcleo do hepatócito ($H_{nv} (\mu\text{m}^3) = 4/3 \pi \cdot r^3$), onde r é o raio nuclear. A circularidade dos núcleos de hepatócitos foi estimada pela fórmula $R_n = 4\pi (\text{área nuclear}) / \text{perímetro nuclear}^2$. Todas as medidas foram obtidas a partir do *software* Motic Image Plus 2.0 (Motic®).

Análise estatística

Previamente a análise estatística os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Uma vez que a normalidade e homogeneidade foram confirmadas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste *post-hoc* de Tukey. O nível de significância foi de 5%. O *software* SPSS (IBM, Nova Iorque, NY, EUA, versão 20.0) foi utilizado para as análises.

Resultados

Histologia do fígado

O peso do fígado e o índice hepatossomático estão apresentados na Tabela 1. O peso do fígado aumentou, enquanto que o índice hepatossomático diminuiu entre as categorias ($P < 0,01$).

Independentemente da categoria, o fígado apresentou parênquima denso e coloração marrom avermelhada, sem evidências de lobos macroscópicos (Fig. 1). O órgão estava localizado na posição anterior da cavidade abdominal, ventral a bexiga natatória e dorso cranialmente ao estômago. A vesícula biliar estava situada na face interna da porção média do fígado (Fig. 1 e-f).

O parênquima hepático organizado em hepatócitos em formato poligonal, com citoplasma eosinofílico e núcleos redondos basofílicos com nucléolo evidente. Seus lados estavam em contato com o espaço sinusoidal ou com hepatócitos vizinhos nas faces laterais. Além disso, os hepatócitos apresentaram disposição cordonal em camada

dupla contínua rodeada por sinusóides (Fig. 2-a). Não foram observados depósitos de gordura nos hepatócitos em todas as amostras de fígado. Os ductos biliares constituíram-se de epitélio cúbico simples rodeado por uma camada de tecido conjuntivo (Fig. 2-b). E apresentaram diâmetros variáveis e estavam difusos no parênquima. O pâncreas exócrino foi localizado próximo ao mesentério circundando a porção inicial do intestino anterior. Espalhando-se sobre a face ventral do fígado circundando a veia porta que adentra ao parênquima (Fig. 2-e). No parênquima, o tecido pancreático circundava o ducto biliar, grandes veias e as artérias, com distribuição focal. Duas ou mais camadas de células pancreáticas mostraram um arranjo acinar, com um núcleo central e citoplasma granular basofílico (Fig. 2-f).

Percentual de hepatócitos PAS-positivos e hepatócitos Perls positivos

A porcentagem de hepatócitos PAS-positivos (Fig. 2-c) na categoria de berçário (31,6 - 45,3 g) foi maior ($P < 0,05$) em relação ao crescimento (242,1 - 376,4 g) e terminação (846,2-913,1 g) (Fig. 3-a). Os hepatócitos de todas as fases foram positivos à coloração de Perls (Fig. 2-d), porém esta reação aumentou ($P < 0,05$) de acordo com a categoria (Fig. 3-b).

Análise de densidade volumétrica

Os dados de análise de densidade volumétrica estão descritos na Tabela 2. A porcentagem de hepatócitos e sinusóides não diferiu entre as categorias. A densidade média de hepatócitos e sinusóides variou de 77,2% a 89,4% e 10,1% a 18,6%, respectivamente. Os vasos sanguíneos foram maiores ($P < 0,01$) nas fases de berçário e

crescimento, enquanto que os ductos biliares e as CMM's permaneceram inalterados entre as diferentes categorias.

Histomorfometria dos hepatócitos

Os parâmetros histomorfométricos dos hepatócitos são apresentados na Tabela 3. A área (μm^2) e o perímetro (μm) dos hepatócitos e a área (μm^2), perímetro (μm) e volume (μm^3) dos núcleos dos peixes de terminação foram menores ($P < 0,01$) do que das categorias de berçário e crescimento. As demais variáveis morfométricas não diferiram significativamente ($P < 0,05$).

Discussão

No Brasil, estudos histológicos e histométricos do tecido hepático em peixes nativos de piscicultura são escassos, especialmente em peixes do gênero *Pseudoplatystoma*. Assim, a determinação dos aspectos histológicos normais do fígado é um passo crucial para a compreensão das relações entre as características morfofuncionais em relação ao crescimento e às fases de desenvolvimento corporal em condições comerciais. Este estudo é um dos primeiros a abordar as características histomorfométricas do tecido hepático em surubins em diferentes estágios de desenvolvimento: berçário (31,6 - 45,3 g), crescimento (242,1 - 376,4 g) e terminação (846,2 - 913,1 g).

O índice hepatossomático é um biomarcador interessante para monitorar e especular sobre o manejo nutricional associado às características histológicas do fígado. O índice hepatossomático é espécie-específico, e está relacionado com a deposição de lipídios e carboidratos (glicogênio) nos hepatócitos. Entre indivíduos da mesma espécie,

esse índice pode ser afetado pelo sexo, idade, estação do ano e condições fisiológicas. Entre os teleósteos essa relação pode variar de 1 a 2% (Bruslé & Anadon, 1996). No surubim híbrido mantido tanques-rede, o índice hepatossomático foi afetado pelo nível de proteína digestível na dieta, variando de 1,3 a 1,8% (Honorato *et al.*, 2014). No presente estudo, a variação do índice hepatossomático entre as diferentes categorias foi esperado devido a diferença de idade e estado metabólico do fígado; Entretanto, o índice pouco mudou entre indivíduos da mesma categoria.

Na avaliação macroscópica, o fígado apresentou um único lobo em todas as categorias estudadas. Essa característica morfológica é muito variável entre as espécies de peixes (Bruslé & Anadon, 1996, Vicentini *et al.*, 2005, Bombonato *et al.*, 2007, Bertoluccintini, Vicentini & Bombonato 2008, Costa *et al.*, 2012).

A histoarquitetura do fígado foi semelhante em todas as categorias. A organização do parênquima e estroma foram semelhantes aos relatados por Honorato *et al.* (2014) estudando espécimes de surubins mantidos em tanques-rede e semelhante aos teleósteos nativos do Brasil, como *Leporinus macrocephalus* (Bombonato *et al.*, 2007), *Astyanax altiparanae* (Bertolucci *et al.*, 2008) e peixes exóticos como *Salmo trutta* Rocha *et al.*, 1997) e *Oreochromis niloticus* (Vicentini *et al.*, 2005). O ducto biliar e o pâncreas exócrino do sorubim híbrido são semelhantes a vários teleósteos (Bombonato *et al.*, 2007, Bertolucci *et al.*, 2008, Genten *et al.*, 2009, Costa *et al.*, 2012, Dabrowska, Ostaszewska, Kamaszewski, Antoniak, Napora-Rutkowiski, Kopko, Lang, Frick & Lehtonen, 2012). Esta estrutura foi classificada como tipo venoso de acordo com Akiyoshi & Inoue (2001), que é desprovida de vasos periféricos. Observou-se que o tecido pancreático envolveu as principais veias e artérias hepáticas formando o hepatopâncreas. No entanto, a distribuição difusa não foi observada, ao contrário de outros peixes, como *Astyanax altiparanae*, *Leporinus macrocephalus*, *Oreochromis*

niloticus e *Colossoma macropomum* (Vicetini *et al.*, 2005, Bertolucci *et al.*, 2008, Costa *et al.*, 2012;).

O acúmulo de lipídeos nos hepatócitos de peixes não é incomum, e está relacionado ao desequilíbrio nutricional, especialmente proteínas e lipídios das dietas artificiais. Em geral, os hepatócitos com depósitos de lipídeos têm vacúolos arredondados no citoplasma; Além disso, o deslocamento do núcleo para a periferia da célula é observado (Takashima & Hibiya, 1995, Gisbert *et al.*, 2008, Darias, Gómez, Tello & Gisbert 2015). Nos hepatócitos dos peixes do presente estudo não foram observadas características compatíveis com as descritas para hepatócitos contendo depósitos lipídicos. Esse fato é possivelmente devido ao baixo conteúdo de lipídios na dieta fornecida (8% de lipídios brutos) e ao adequado balanceamento nutricional das dietas comerciais, uma vez que o conteúdo lipídico na dieta está positivamente correlacionado com a deposição de lipídeos no tecido hepático (Bolla *et al.*, 2011). Ostaszewska *et al.* (2011), avaliando o efeito de dietas comerciais e experimentais, observaram maior acúmulo de glicogênio do que os lipídios em hepatócitos de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, independentemente do tipo de dieta. Por outro lado, em juvenis de tilápias superalimentados com dietas comerciais, Taddese *et al.* (2014) observaram uma marcado acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, evidenciado pela presença de vacúolos circulares nos hepatócitos e deslocamento do núcleo para a periferia da célula.

O glicogênio é geralmente armazenado no citoplasma de hepatócitos dos peixes e é a primeiro a ser mobilizado durante a privação alimentar (Rios, Moraes, Oba, Fernandes, Donatti, Kalinin & Rantin 2006). É um biomarcador interessante do estado nutricional e está correlacionado com a área de hepatócitos (Rašković *et al.*, 2015). No presente estudo, os peixes na categoria de terminação apresentaram menor porcentagem

de hepatócitos PAS positivos em relação à categoria de berçário. Possivelmente, a redução do teor de glicogênio no tecido hepático dos peixes na categoria terminação está relacionada ao manejo alimentar. Nesta categoria, os peixes foram alimentados apenas uma vez por dia a 2% do peso corporal, enquanto que os peixes da categoria berçário foram alimentados *ad libitum*. Isto sugere que os peixes da categoria de terminação possam ter utilizado glicogênio como fonte de energia. A fonte de energia durante a diminuição da alimentação em peixes varia entre as espécies: algumas utilizam principalmente glicogênio, enquanto outras usam lipídios ou proteínas. De acordo com Gisbert *et al.* (2008) peixes recebendo dietas inadequadas podem apresentar uma redução no conteúdo de glicogênio hepático e lipídios. A utilização de glicogênio como fonte de energia pode ter refletido tanto no tamanho das células dos hepatócitos como no tamanho nuclear, indicando a perda de material armazenado a partir do citoplasma e reduzida atividade nuclear (Power *et al.*, 2000, Souza, Lunardi, Vasques, Casaletti, Nakaghi & Urbinati 2000).

Nas categorias de crescimento e de terminação, a percentagem de hepatócitos positivos para a reação de Perl foi maior do que na categoria de berçário. Possivelmente, este resultado está associado à idade dos peixes (Carpenè, Serra, Manera & Isani 1999). O fígado é um órgão crítico no metabolismo do ferro, sendo este armazenado tanto de formas de ferritina quanto de hemossiderina (van Dijk, Lagerwerf, van Eijk & Leijnse 1975, Richter 1978; Grotto, 2010). Ambas as formas podem ser detectadas usando a microscopia de campo claro após a reação de Perl. Portanto, a detecção microscópica de ferro no citoplasma pode ser normal na ausência de alterações histopatológicas. Em contrapartida, os depósitos de hemossiderina no fígado têm sido frequentemente observados associados ao catabolismo intenso de eritrócitos anormais ou devido à

retenção de centros melanomacrófagos em resposta à estimulação imunológica e à fome prolongada (Agiros & Roberts, 2003, Rios *et al.* 2007)

As análises de densidade volumétrica revelaram porcentagens semelhantes às relatadas em outras espécies (Hampton, Lantz & Hinton 1989, Rocha *et al.*, 1997). No entanto, a porcentagem de hepatócitos e sinusóides permaneceu semelhante em todas as categorias. A maior rede vascular nas categorias de berçário e crescimento sugere a presença de maior suporte para a proliferação de tecidos relacionados à taxa metabólica. A remodelação do tecido hepático é mais pronunciada após a maturidade sexual de fêmeas durante a fase de vitelogenese (Jordanova, Rocha, Rebok & Rocha 2013). No presente estudo, os peixes da categoria de terminação não haviam atingido a maturidade sexual.

Medidas histomorfométricas do citoplasma e de área nuclear de hepatócitos são biomarcadores interessantes do estado metabólico da célula. As variações no tamanho dos núcleos demonstram alterações no conteúdo de proteínas não cromossômicas e subsequentes adaptações das funções celulares (Strüßmann & Takashima 1990). Neste estudo, a área citoplasmática e do núcleo dos hepatócitos dos peixes da categoria de terminação foram menores do que em todas as outras categorias. Isso pode ser um reflexo do manejo nutricional, como a frequência alimentar e taxa de alimentação. Na terminação frequência alimentar e taxa de alimentação foram menores em relação aos peixes na categoria de berçário. Neste contexto, é possível que a frequência alimentar tenha implicado na redução do metabolismo dos hepatócitos tal como expresso pela pequena área nuclear. De acordo com Rašković *et al.* (2011) os parâmetros morfométricos como área de hepatócitos e área nuclear de hepatócitos são indicadores da atividade metabólica dos hepatócitos. Em peixes alimentados inadequadamente ou com restrição alimentar, a área do núcleo dos hepatócitos diminui conforme relatado por

Strüssmann & Takashima (1990), Power *et al.* (2000), Souza *et al.* (2001) e Rios *et al.* (2007). Por outro lado, a área dos hepatócitos reflete o estado nutricional do fígado, pois seu tamanho depende da quantidade de glicogênio ou de lipídios armazenados no citoplasma (Ostaszewska *et al.*, 2011). Assim, a redução na área de hepatócitos dos peixes da categoria de terminação em relação aos peixes de categoria de berçário pode estar associada à menor porcentagem de hepatócitos PAS-positivos. De acordo com Rios *et al.* (2007), o glicogênio hepático é geralmente a primeira reserva a ser mobilizada durante a privação alimentar e a redução na área do citoplasma pode refletir a mobilização de reservas de glicogênio.

Conclui-se que a histoarquitetura do tecido hepático do surubim híbrido foi semelhante à descrição morfológica para na maioria dos teleósteos. A categoria de terminação apresentou menor citoplasma e volume nuclear em relação à categoria de berçário. Essas alterações histomorfo métricas estão relacionadas ao crescimento corporal e representam uma resposta adaptativa ao metabolismo. Adicionalmente, a área de hepatócitos, a área do núcleo dos hepatócitos e o volume nuclear de hepatócitos podem ser biomarcadores úteis para estudos experimentais sobre as respostas nutricionais e avaliação da saúde e estado nutricional dos peixes.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro. À Pirai Piscicultura por fornecer os espécimes de surubim híbrido. Agradecemos também ao Sr. Claudio Gonçalves o apoio nas colorações histológicas.

Referências

- Abràmoff M.D., Magalhães P.J. & Ram S.J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Agius C. & Roberts R J. (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* **26**, 499-509.
- Akiyoshi H. & Inoue A. (2004) Comparative histological study of teleosts livers in relations to phylogeny. *Zoological Science* **21**, 841–850.
- AMVA (2013) *Guidelines for the Euthanasia of Animals*. American Veterinary Medical Association, Schaumburg.
- Bertolucci B., Vicentini C.A., Vicentini I.B.F. & Bombonato M.T.S. (2008). Light microscopy and ultrastructure of the liver of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* **30**, 73-76.
- Bolla S., Nicolaisen O. & Amin A. Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. Histological and biochemical aspects. *Aquaculture* **312**, 1117-125.
- Bombonato M.T.S., Rochel S.S., Vicentini C.A. & Vicentini I.B.F. (2007) Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* **29**, 81-85.
- Bruslé J, Anadon G.G. (1996). The structure and function of fish liver. In: *Fish morphology* (Ed by J.S.D Munshi & H.M Dutta). pp. 77-93. Science Publishers, Brookfield.

- Carpenè E., Serra R., Manera M. & Isani G. (1999) Seasonal changes of zinc, copper and iron in gilthead sea bream (*Spaurus aurata*) fed fortified diets. *Biological Trace Element Research* **69**, 121-139.
- Carson F.L. & Hladik C. (2009) Histotechnology: A self-instructional text. American Society for Clinical Pathology Press, Hong Kong.
- Costa G.M., Ortis R.C., Lima M.G, Casals J.B. Lima A.R. & Kfoury Jr. (2012) Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Pesquisa Veterinária Brasileira* **32**, 947-950.
- Dabrowska H., Ostaszewska T., Kamaszewski M., Antoniak A., Napora-Rutkowski L., Kopko O., Lang T. Fricke, N. F. & Lehtonen K.K. (2012) Histopathological, histomorphometrical and immunohistochemical biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **78**, 14-21.
- Darias M.J., Gómez M.A., Tello S. & Gisbert E. (2015) Growth, survival and the histology of the digestive tract of juvenile *Osteoglossum bicirrhosum* (Cuvier, 1829) fed three diets containing different protein and lipid levels. *Journal of Applied Ichthyology* **31**, 67-73.
- Deplano M., Diaz J.P., Connes R., Kentouri-Divanach, M. & Cavalier, F. (1991) Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Marine Biology* **108**, 361–371.
- Diaz J.P., Mani-Ponset E., Guyot E. & Connes R. (1998) Hepatic cholestasis during the post-embryonic development of fish larvae. *Journal of Experimental Zoology* **280**, 277-287.

- Fantini L.E., Rodrigues R.A., Nunes A.L., Sanchez M.S.S., Ushizima T.T. & Campos C.M. (2013) Rendimento de carcaça de surubins *Pseudoplatystoma* spp. produzidos em tanque rede e viveiro. *Revista Brasileira de Saúde Produção Animal* **14**, 538-545.
- Field H.A., Ober E.A., Roeser T. & Stainier D.Y.R. (2003) Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis. *Development Biology* **253**, 279-290.
- Fishelson L. & Becker K. (2001) Development and aging of the liver and pancreas in the domestic carp, *Cyprinus carpio*: from embryogenesis to 15-year-old fish. *Environmental Biology of Fishes* **61**, 85-97.
- Freere R.H. & Weibel E.R. (1967) Stereologic techniques in microscopy. *Journal of the Royal Microscopical Society* **87**, 25-34.
- Genten F., Terwinghe E. & Danguy A. (2009) *Atlas of fish histology*. Science Publisher, Enfield, NH, USA.
- Gisbert E., Moreira C., Castro-Ruiz D., Öztürk S., Fernández C., Gilles S., Nuñez J., Duponchelle F., Tello S., Renno J.F., García-Dávila C. & Darias M.J. (2014) Histological development of the digestive system of the Amazonian pimelodid catfish *Pseudoplatystoma punctifer*. *Animal* **11**, 1765-1776.
- Gisbert E., Ortiz-Delgado J.B. & Sarasquete C. (2008) Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology* **23**, 1525-1539.
- Grotto H.Z.W. (2010) Fisiologia e metabolismo do ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* **32**, 8-17.
- Hamilton P.W. & Allen D.C. (1995) Morphometry in histopathology. *Journal of Pathology* **175**, 369-379.

- Hampton J.A., Lantz R. C. & Hinton D.E. (1989) Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver: III. Morphometrics Analysis of parenchyma, stroma and component cell types. *The American Journal of Anatomy* **185**, 58-73.
- Hinton D.E., Segner H. & Braunbeck T. (2001) Toxic responses of the liver. In: *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts* (ed. by D. Schlenk & W.H. Benson), pp 224-268. Taylor & Francis, New York.
- Hinton, D.E., Hampton J.A. & Lantz R.C. (1985) Morphometric analysis in rainbow trout: Quantitatively defining an organ of xenobiotic metabolism. *Marine Environmental Research* **17**, 238-239.
- Honorato C.A., Ushizima T.T., Quintana C.I.F., Campos C.M., Marcondes V. M., Nascimento C.A. & Santamaria F.M. (2014) Níveis de proteína digestível para surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) criados em tanque-rede. *Semina: Ciência Agrárias* **35**, 2781-2792.
- IBGE (2015). *Produção da Pecuária Municipal*. IBGE, Rio de Janeiro.
- Jordanova M., Rocha M. J., Rebok K. & Rocha E. (2013) Variation in the volumes of parenchyma and stroma of the liver and in the cytology of hepatocytes are associated with gonadal stages in female Ohrid trout (*Salmo letnica*). *Ichthyology Research* **60**, 26-35.
- Liraço A.D.S., Romagosa, E. & Scorvo-Filho J.D. (2011) Desempenho produtivo de *Pseudoplatystoma corruscans* estocados em sistemas de criação: semi-intensivo (viveiro escavado) e intensivo (tanque-rede). *Ciência Rural* **41**, 524-530.
- Marcos R., Monteiro, R.A.F. & Rocha E. (2012) The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *Journal of Anatomy* **220**, 303-317.

- NRC (2011) *Nutrient requirements of fish and shrimp*. The National Academies Press, Washington
- Oberholzer M., Östreicher M., Christen H. & Brühlmann M. (1996) Methods in quantitative image analysis. *Histochemistry and Cell Biology* **105**, 333-355.
- Ostaszewska T., Dabrowski K., Kwasek K., Verri T., Kamaszewski M., Sliwinski J. & Napora-Rutkowski L. (2011) Effects of various diet formulations (experimental and commercial) on the morphology of the liver and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Research* **42**, 1796-1806.
- Padua D.M.C., Urbinati E.C., Nakaghi L.S.O., Carneiro D.J. & Malheiros E.B. (2000) Morfometria de hepatócitos de pacu *Piaractus mesopotamicus*, submetido à dietas com níveis crescentes de levedura de álcool, *Saccharomyces cerevisiae*. *Ars Veterinaria* **16**, 1-8.
- Pereira B. F., Alves R.M.S., Alves A.L., Senhorini J.A., Rocha R.C.G.A., Scalize P.H., Pitol D L. & Caetano F.H. (2014) Effects of biodegradable detergents in morfological parameters of liver in two neotropical fish species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). *Microscopy Research* **2**, 39-49.
- Power D.M., Melo J. & Santos R.A. (2000) The effect of food deprivation and refeeding on the liver thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *Journal of Fish Biology* **56**, 374-387.
- Rašković B., Čičovački S., Ćirić M., Marković Z. & Poleksić V. (2015) Integrative approach of histopathology and histomorphometry of common carp (*Cyprinus carpio* L.) organs as a marker fish health state in pond culture. *Aquaculture Research* **47**, 3455-3463.

- Rašković B.S., Stanković M.B., Marković Z.Z & Polesksić V.D. (2011) Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences* **56**, 87-100.
- Reid I.M. (1980) Morphometric methods in veterinary pathology: A Review. *Veterinary Pathology* **17**, 522-543.
- Richter G.W. (1978) The Iron-loaded cell – The cytopathology of iron storage. *American Journal of Pathology* **91**, 363-389.
- Rios F.S., Donatti L., Fernandes M.N., Kalinin A.L. & Rantin F.T. (2007) Liver histopathology and accumulation of melano-macrophage centres in *Hoplias malabaricus* after long-term food deprivation and re-feeding. *Journal of Fish Biology* **71**, 1393-1406.
- Rios F.S., Moares G., Oba E.T., Fernandes M. N., Donatti L., Kalinin A.L. & Rantin F.T. (2006) Mobilization and recovery of energy stores in traíra, *Hoplias malabaricus* Bloch (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after re-feeding. *Journal Comparative Physiology B* **176**, 721-728.
- Rocha E., Monteiro R.A.F. & Pereira C.A. (1997) Liver of the Brown Trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A stereological study at light and electron microscopic levels. *The Anatomical Record* **247**, 317-328.
- Scorvo Filho J.D., Romagosa E., Ayroza L.M.S. & Frascá-Scorvo C. (2008) Desempenho produtivo do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), submetidos a diferentes densidades de estocagem em dois sistemas de criação: intensivo e semi-intensivo. *Boletim do Instituto de Pesca* **34**, 181-188.
- Souza V.L., Lunardi L.O., Vasques L.H., Casaletti L., Nakaghi L.S.O. & Urbinati E.C. (2001) Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver

- glycogen in pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887) during food restriction and refeeding. *Brazilian Journal of Morphological Sciences* **18**, 15-20.
- Strüssmann C.A. & Takashima F. (1990) Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *Journal of Fish Biology* **36**, 59-65.
- Taddese F., Huh M.D., Bai S.C. & Vijverberg J. (2014) Histological changes of liver in overfed young Nile tilapia. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* **9**, 63-74.
- Takashima F. & Hibiya T. (1995) *An atlas of fish histology. Normal and pathological features*. Kodansha, Tokyo.
- van Dijk J.P., Lagerwerf A.J., van Eijk H.G. & Leijnse B. (1975) Iron metabolism in the tench (*Tinca tinca* L.). *Journal of Comparative Physiology* **99**, 321-330.
- Vicentini C.A., Franceschini-Vicentini I.B., Bombonato M.T.S., Bertolucci B., Lima S.G. & Santos A.S. (2005) Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. *International Journal Morphology* **23**, 211-216.

Tabela 1 Média (\pm dp) do peso do fígado e do índice hepatossomático (IH) de surubim híbrido em diferentes categorias produzido em piscicultura intensiva

	Categories		
	Berçário	Crescimento	Terminação
	(31,6 - 45,3 g)	(242,1 - 376,4 g)	(846,2 - 913,1 g)
Peso do fígado (g)	0,49 \pm 0,07 ^a	3,35 \pm 0,57 ^b	7,80 \pm 0,52 ^c
IH (%)	1,34 \pm 0,11 ^a	1,08 \pm 0,12 ^b	0,89 \pm 0,06 ^c

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente pelo teste de Tukey

(P <0,01); dp, desvio-padrão.

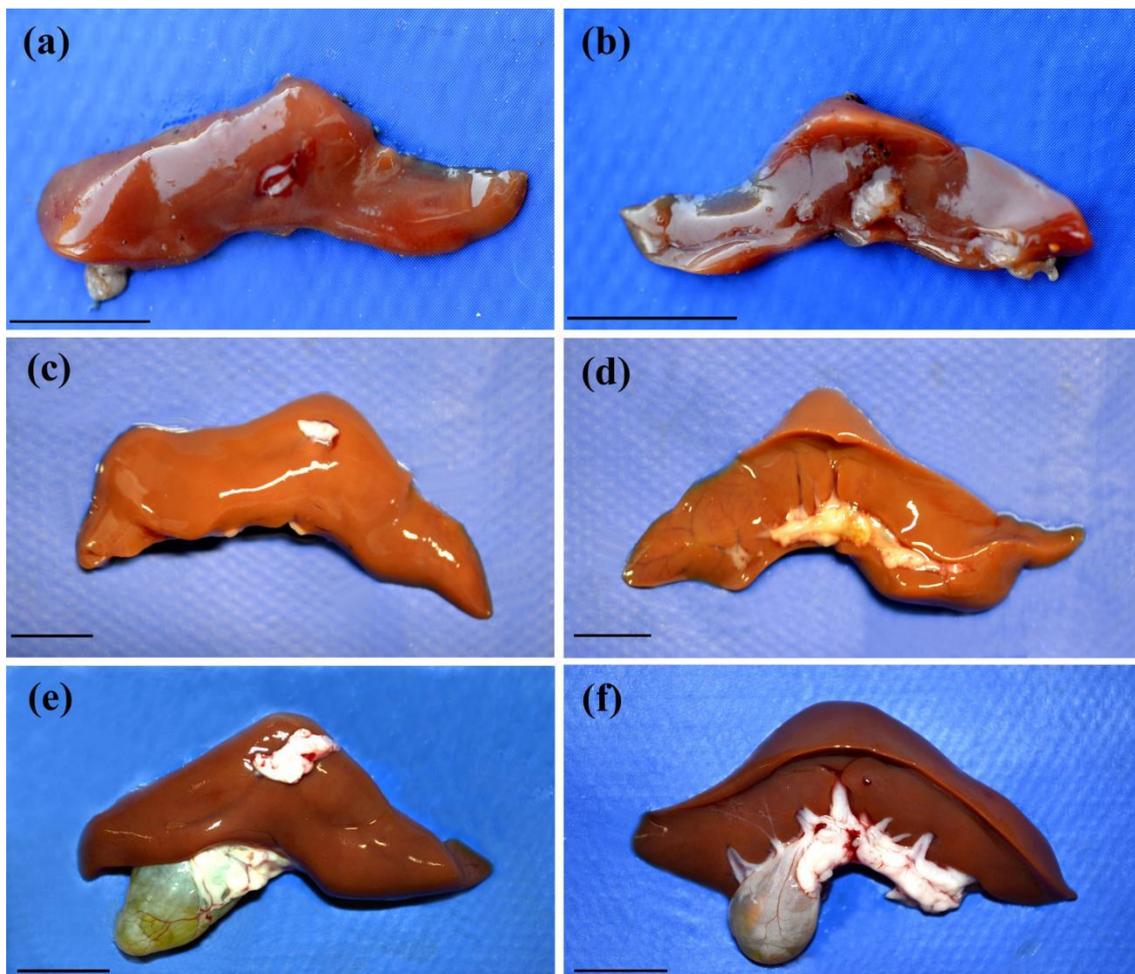


Figura 1 Aspectos macroscópicos dorsal e ventral do fígado em surubim híbrido de diferentes categorias produzido em piscicultura de intensiva. Categoria berçário (a -b) apresentou coloração cor marrom avermelhada; Categoria crescimento (c-d) apresentou mostra cor marrom claro em relação a outras categorias; Categoria terminação (e -f) fígado tornou-se cor marrom escuro. Observe os vasos portais distribuídos ao longo do parênquima hepático. Barra de escala = 1cm.

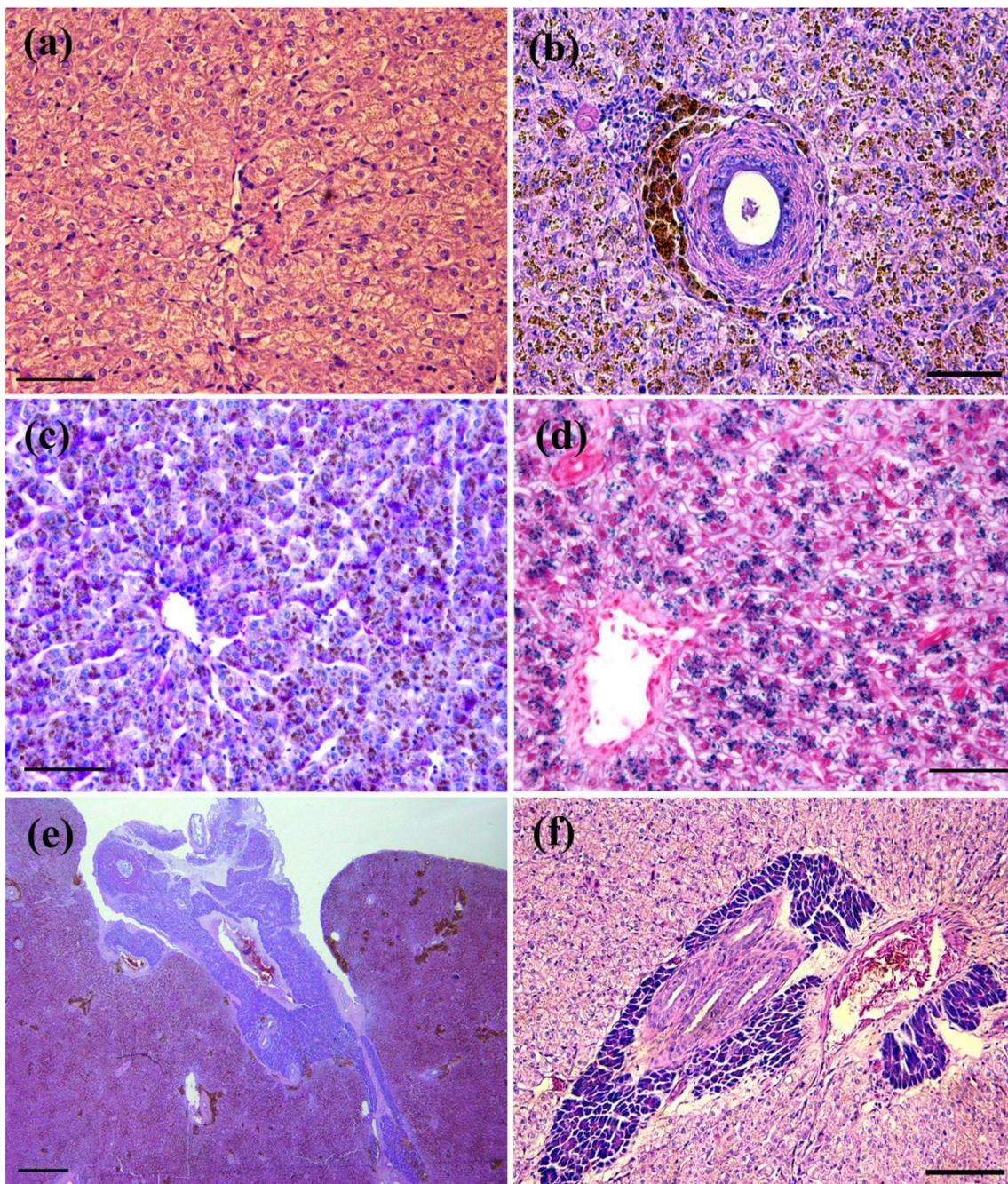


Figura 2 Secções histológicas transversais do parênquima hepático em surubim híbrido de diferentes categorias produzido em piscicultura de intensiva. (a) categoria berçário; Arranjo cordonal dos hepatócitos agrupados em duas camadas circundados por sinusóides; H&E, barra de escala = 50 μ m. (B) categoria crescimento; Detalhe do ducto biliar constituído por epitélio simples, rodeado por tecidos conjuntivos e centros de melanomacrófagos. Os hepatócitos apresentam citoplasma com depósitos castanhos; H & E, barra de escala = 50 μ m. (C) categoria terminação; hepatócitos PAS positivos,

vaso portal e sinusóides evidentes, barra de escala = 50 μm . (D) categoria crescimento; hepatócitos Perls positivos indicando a deposição de ferro férrico citoplasmático, barra de escala = 50 μm . (E) categoria terminação, uma porção de tecido pancreático que entra no parênquima hepático, os vasos sanguíneos dispostos nas regiões central e periférica, barra de escala = 500 μm . (F), categoria berçário; o tecido pancreático circundando os ductos biliares e uma veia porta, as células pancreáticas mostram grânulos citoplasmáticos basofílicos. H&E, barra de escala = 100 μm .

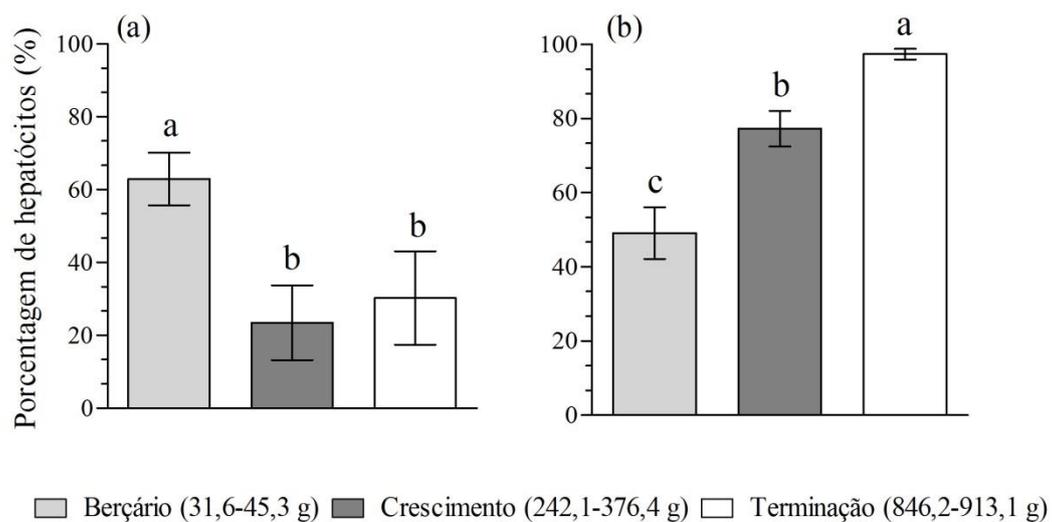


Figure 3 Porcentagem (média \pm IC 95%) de hepatócitos PAS positivos (a) e Perls positivos (b) em surubim híbrido de diferentes categorias produzido em piscicultura intensiva. Barras com letras distintas (a, b, c) diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2 Média (\pm dp) da densidade volumétrica (%) de estruturas do tecido hepático de surubim híbrido de diferentes categorias produzido em piscicultura intensiva

Estruturas (%)	Categorias		
	Berçário (31,6 - 45,3 g)	Crescimento (242,1 - 376,4 g)	Terminação (846,2 - 913,1 g)
Hepatócitos	84,52 \pm 2,82	85,21 \pm 4,33	83,76 \pm 3,76
Sinusóides	12,21 \pm 3,51	11,71 \pm 3,79	12,79 \pm 3,50
Artéria	0,27 \pm 0,51	0,63 \pm 0,61	1,80 \pm 1,42
Veia	2,98 \pm 0,25 ^a	3,35 \pm 0,18 ^a	1,56 \pm 1,19 ^b
Ducto biliar	0,05 \pm 0,10	0,16 \pm 0,20	0,31 \pm 0,26
CMMs	0,00 \pm 0,00	0,04 \pm 0,07	0,01 \pm 0,01

CMMs: Centros de melanomacrófagos. Médias seguidas de letras diferentes em coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey test ($P < 0,01$); dp, desvio-padrão.

Table 3 Características morfométricas (média \pm dp) de hepatócitos de surubim híbrido de diferentes categorias produzidos em piscicultura intensiva

Parâmetros morfométricos	Categories		
	Berçário (31,6 - 45,3 g)	Crescimento (242,1 - 376,4 g)	Terminação (846,2 - 913,1 g)
Perímetro (μm)	45,35 \pm 2,53 ^a	44,04 \pm 1,87 ^{ab}	40,81 \pm 1,91 ^b
Área (μm^2)	131,18 \pm 12,37 ^a	121,96 \pm 11,64 ^{ab}	107,15 \pm 8,71 ^b
Perímetro do núcleo (μm)	14,45 \pm 0,58 ^a	14,61 \pm 0,50 ^a	13,54 \pm 0,53 ^b
Área do núcleo (μm^2)	15,26 \pm 1,25 ^a	15,50 \pm 0,96 ^a	13,39 \pm 2,07 ^b
<i>Rpnc</i>	32,31 \pm 1,47 ^a	33,60 \pm 0,96 ^a	33,51 \pm 1,59 ^a
<i>Ranc</i>	12,18 \pm 1,13 ^a	13,59 \pm 1,42 ^a	12,92 \pm 1,16 ^a
Volume do núcleo (μm^3)	39,13 \pm 4,96 ^a	38,17 \pm 3,08 ^a	30,35 \pm 4,79 ^b
Circularidade do núcleo (0-1)	0,91 \pm 0,01 ^a	0,91 \pm 0,01 ^a	0,91 \pm 0,01 ^a

Rpnc: Relação perímetro do núcleo/citoplasma; *Ranc*: Relação área do núcleo/citoplasma; Médias seguidas de letras diferentes em coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey test ($P < 0,01$); dp, desvio-padrão.