



Núcleo de Meio Ambiente
Universidade Federal do Pará
Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá
Belém, Pará, Brasil
<https://periodicos.ufpa.br/index.php/agroecossistemas>

Vivian Cristian de Freitas Lima

Universidade Federal do Oeste do Pará
vivian.vl133@gmail.com

Andreia S. Oliveira

Universidade Federal do Oeste do Pará
andreiasousa381@gmail.com

Debora K.T Moreira

Instituto Federal de Brasília
deboraktmoreira@gmail.com

Alanna S.L. Silva

Universidade Federal do Oeste do Pará
aslsilva@yahoo.com.br

Alberto C.F Silva

Universidade Federal do Oeste do Pará
alberto.cfs@ufopa.edu.br

Gustavo da Silva Claudiano

Universidade Federal do Oeste do Pará
gsclaudiano@gmail.com

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE LEUCÓCITOS E TROMBÓCITOS SANGUÍNEOS EM *Piaractus* *mesopotamicus* DURANTE A SEPSE

RESUMO: A sepsé é definida como disfunção orgânica com alta mortalidade. Durante esse processo o sistema hematológico desempenha um papel crítico. Assim, o trabalho objetivou analisar as alterações morfológicas no leucograma e no trombograma pelo método indireto no curso da sepsé em *Piaractus mesopotamicus*. Para tanto, foram utilizados 98 pacus, divididos em dois grupos, um deles recebeu 0,5 ml de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65% (controle) e outro recebeu o mesmo volume contendo o inóculo bacteriano (18×10^8 CFU/ml – desafio). Para avaliar tais alterações na evolução da sepsé foram realizadas coletas de sangue dos peixes 1, 3, 6 e 9 horas após inoculação e no grupo controle (n=10). Uma alíquota do sangue foi destinada a hemocultura e outra na determinação do número de leucócitos e de trombócitos pelo método indireto e a avaliação das alterações morfológicas nas extensões sanguíneas. A aeromonose foi confirmada pela hemocultura positiva em todas as amostras dos grupos desafiados. A análise do leucograma demonstrou aumento significativa ($p < 0,05$) dos leucócitos nos tempos mais tardios, 9 e 6 HPI em relação ao grupo controle. Da análise diferencial observou-se leucopenia ($p < 0,05$; 3 HPI) e consumo dos trombócitos. Verificou-se que com o aumento da infecção os pacus septicêmicos desenvolvem um quadro de granulocitose e monocitose ($p < 0,05$). Concluiu-se que a inoculação com *A. hydrophila* induziu a sepsé com hemocultura positiva com leucocitose nos pacus desafiados e causa intensa alteração na morfologia dos leucócitos e trombócitos.

PALAVRAS-CHAVE: Hemocultura, Leucograma, Morfologia, *Aeromonas hydrophila*, Teleósteos.

Recebido em: 2019-11-22
Avaliado em: 2020-07-14
Aceito em: 2020-07-31

MORPHOLOGICAL CHANGES OF BLOOD LEUKOCYTES IN *Piaractus mesopotamicus* INFECTED WITH *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT: Sepsis is defined as organ dysfunction with high mortality. During this process, the hematological system plays a critical role. Thus, the work aimed to analyze the morphological changes in the leukogram and thrombogram by the indirect method in the course of sepsis in *Piaractus mesopotamicus*. For this, 98 pacus were used, divided into two groups, one received 0.5 ml of sterile 0.65% sodium chloride solution (control) and the other received the same volume containing the bacterial inoculum (1.8×10^8 CFU/ml – challenge). To assess such changes in the evolution of sepsis, blood samples were collected from fish 1, 3, 6 and 9 hours after inoculation and in the control group (n = 10). One aliquot of the blood was used for blood culture and another for determining the number of leukocytes and thrombotics by the indirect method and the evaluation of morphological changes in blood extensions. Aeromonosis was confirmed by positive blood culture in all samples from the challenged groups. The leukogram analysis showed a significant increase ($p < 0.05$) of leukocytes in the later times, 9 and 6 HPI in relation to the control group. Differential analysis showed leukopenia ($p < 0.05$; 3 HPI) and consumption of thrombocytes. It was found that with the increase of the infection the septicemic pacus develops a picture of granulocytosis and monocytosis ($p < 0.05$). It was concluded that inoculation with *A. hydrophila* induced sepsis with positive blood culture with leukocytosis in the challenged pacus and caused an intense change in the leukocyte and thrombotic morphology.

KEYWORDS: Hemoculture, Leukogram, Morphology, *Aeromonas hydrophila*, Teleosts.

CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LOS LEUCOCITOS SANGUÍNEOS EN *Piaractus mesopotamicus* INFECTADOS CON *Aeromonas hydrophila*

RESUMEN: La sepsis se define como disfunción orgánica con alta mortalidad. Durante este proceso, el sistema hematológico juega un papel crítico. Por lo tanto, el trabajo tuvo como objetivo analizar los cambios morfológicos en el leucograma y el trombograma por el método indirecto en el curso de la sepsis en *Piaractus mesopotamicus*. Para esto, se utilizaron 98 pacus, divididos en dos grupos, uno recibió 0,5 ml de solución estéril de cloruro de sodio al 0,65% (control) y el otro recibió el mismo volumen que contenía el inóculo bacteriano ($1,8 \times 10^8$ UFC / ml - desafío). Para evaluar dichos cambios en la evolución de la sepsis, se recogieron muestras de sangre de peces 1, 3, 6 y 9 horas después de la inoculación y en el grupo de control (n = 10). Una parte alícuota de la sangre se usó para el hemocultivo y otra para determinar el número de leucocitos y trombóticos mediante el método indirecto y la evaluación de

los cambios morfológicos en las extensiones de sangre. La aeromonosis se confirmó por hemocultivo positivo en todas las muestras de los grupos desafiados. El análisis de leucogramas mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) de leucocitos en los últimos tiempos, 9 y 6 HPI en relación con el grupo de control. El análisis diferencial mostró leucopenia ($p < 0.05$; 3 HPI) y consumo de trombocitos. Se encontró que con el aumento de la infección, el pacus septicémico desarrolla una imagen de granulocitosis y monocitosis ($p < 0.05$). Se concluyó que la inoculación con *A. hydrophila* indujo sepsis con hemocultivo positivo con leucocitosis en pacus desafiado y causa un cambio intenso en los leucocitos y la morfología trombótica

PALABRAS CLAVES Hemocultivo, Leucograma, Morfología, *Aeromonas hydrophila*, Teleósteos.

INTRODUÇÃO

Os índices hematológicos são importantes indicadores da sanidade nas pisciculturas e na avaliação do sistema imunológico em teleósteos (YUNIS-AGUINAGA et al., 2016; CLAUDIANO et al., 2019).

A avaliação hematológica vem tornando-se uma prática de rotina para avaliar a saúde de peixes criados intensivamente (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007). A intensificação favorece o surgimento das doenças infecciosas, sendo, um dos principais entraves para a produção aquícola (SILVA et al., 2012; DIAS et al. 2016), e responsáveis por altas taxas de mortalidade em diferentes espécies de

teleósteos (DA SILVA, 2010; PÁDUA et al., 2010).

Durante um processo infeccioso o sistema hematológico desempenha um papel crítico (AIRD, 2003; CLAUDIANO et al., 2019). Esta ativação pode ser observada pela alteração na quantidade dos leucócitos e trombócitos sanguíneos e nas alterações morfológicas destas células durante um processo inflamatória e/ou infeccioso em teleósteos (YUNIS-AGUINAGA et al., 2016; CLAUDIANO et al., 2019). A ativação e a produção excessiva dos leucócitos podem resultar em lesões teciduais sérias, que em última análise podem levar a

falência múltipla dos órgãos (BERNARD et al., 2000; HELLER et al., 2002).

As alterações leucocitárias mais frequentes em processos infecciosas são presença de granações tóxicas, vacuolização e/ou presença de corpos de Döhle (ZAHOREC, 2001; AIRD 2003; CLAUDIANO et al., 2019). As granações tóxicas refletem uma perturbação da maturação dos mesmos, com persistência dos grânulos azurófilos nos estádios celulares maduros, ou podem ser o resultado da endocitose de agentes tóxicos (bactérias, proteínas séricas desnaturadas) com formação de novos grânulos anormais (BERNARD et al., 2000; FUNKE et al., 2000).

Assim, o estudo das alterações do hemograma e do esfregaço de sangue periférico são imprescindíveis para melhor compreensão da fisiopatologia das enfermidades e desenvolvimento de estratégias voltadas no controle das doenças em peixes. Com base nas informações, este trabalho utilizou a *Aeromonas hydrophila*, causadora de surtos sépticos com altas taxas de

mortalidade em peixes tropicais e ameaça à saúde pública (CHOPRA et al., 2009; ZHANG et al., 2016; CLAUDIANO et al., 2020), com o objetivo de quantificar pelo método indireto os leucócitos e trombócitos e avaliar as alterações morfológica semiquantitativa destas células durante a sepse em *Piaractus mesopotamicus*.

MATERIAL E MÉTODOS

PEIXES E BACTÉRIA

Foram utilizados 98 pacus, *Piaractus mesopotamicus* (180,71 ± 38,1g / 21,27 ± 6.7 cm), acondicionados (n=10) em 10 caixas de fibra (250 L / 7 dias de aclimatação), abastecidas com água de poço artesiano, vazão de 1 L/min, aeração artificial e alimentação comercial (3% da biomassa, 28% de PB e 4000 kcal de EB kg⁻¹). A qualidade da água permaneceu na faixa de conforto para os peixes durante todo o ensaio (od=5,3 mg/L: to= 8,87 °C; pH=7,53 e a condutividade elétrica=118,26 µS/cm) (Boyd 1990, Ostrensky e Böeger 1998) (Aprovação do Comitê de Ética nº 008577/12).

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados (GARCIA; MORAES, 2009), que foram necropsiados e fragmentos de encéfalo, rim e sangue colhidos assepticamente para cultura bacteriológica. A identificação das colônias seguiu as recomendações de Popoff (1984) e Abeyta Júnior et al. (1990), acrescida de provas bioquímicas (Bactray (Bactray 3 - Laborclin®). Uma amostra do cultivo foi utilizada para extração do DNA em "Genomic DNA purification kit (Wizard). Ao final, obteve-se a concentração de DNA de 1690,9 ng/μL, com relação 260/280 e 260/230 2,02 e 2,04, respectivamente. A amplificação do gene 16 S RNA ribossômico seguiu (MARINHO-NETO et al., 2019). As sequências foram analisadas pelo algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O limite de similaridade foi de 98% na análise de BLAST e alcançou 99% de similaridade com *A. hydrophila*.

Após identificação da *Aeromonas hydrophila* foi realizado um experimento prévio utilizando 48 pacus para determinação da dose bacteriana letal para 50% dos peixes (DL50 = 18 x

10⁸ CFU/ml) para a indução da sepse (CLAUDIANO et al., 2019).

INDUÇÃO DA SEPSE E COLETA DAS AMOSTRAS

Os peixes foram anestesiados (solução de benzocaína 1:20.000, em álcool 98° a 0,1 g/mL) (WEDEMEYER, 1970) até o plano cirúrgico de Ross e Ross (2008). Os animais foram divididos em dois grupos (DIC), um deles recebeu 0,5 mL de solução salina esterilizada a 0,65% (grupo controle) e o outro recebeu a 18 x 10⁸ CFU/mL (correspondente DL50%) dissolvidos no mesmo veículo e volume por animal previamente determinada.

Para avaliação da sepse as amostras de sangue foram coletadas por punção caudal (3,0 ml de sangue/amostra) nos tempos pré-determinados de zero (controle), 1, 3, 6 e 9 horas pós-infecção (HPI) (MARINHO-NETO et al., 2019).

ANÁLISE DO LEUCOGRAMA E DA MORFOLOGIA DE LEUCÓCITOS E TROMBÓCITOS

A partir das amostras de sangue foi realizado a contagem de eritrócitos em

câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Natt e Herrick (1952) como diluente na proporção de 1:200 (Tavares-Dias et al. 1999). A contagem indireta dos leucócitos e dos trombócitos totais foi realizada segundo ISHIKAWA et al. (2008).

Nas extensões foi realizou-se a contagem diferencial de leucócitos (CLAUDIANO et al., 2019) e, também, foram avaliadas semiquantitativamente as alterações morfológicas de leucócitos e trombócitos da seguinte maneira: (Zero) granulação normal, (+) leve, (++) aproximadamente 50% dos neutrófilos contendo grânulos escuros, (+++) intensa granulação na maioria das células, e (+++++) GT grosseiras (SALGADO et al., 2007).

HEMOCULTURA

A sepse foi confirmada a partir da hemocultura realizada em todos os animais. Após a coleta do sangue total 20 µL foram semeados em ágar tríptico de soja (TSA), com adição de ampicilina (10 mg/L), em triplicata, para incubação por 24 horas, a 30 °C, em afrofilia e

avaliação em contador de colônias, em seguida foi realizado a confirmação da espécie através das provas microbiológicas e molecular supracitadas (CLAUDIANO et al., 2019; MARINHO-NETO et al., 2019).

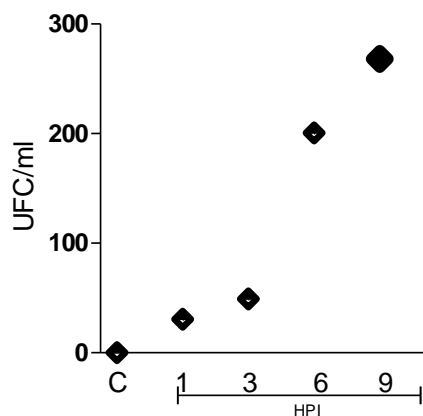
ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises sanguíneas foram submetidos às análises de variância em delineamento inteiramente casualizado (DIC), teste de normalidade alfa 5% (Kolmogorov – Smirnov, Anderson-Darling). Estabelecida a normalidade foi realizada comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou de Dunn's (5%). O programa estatístico utilizado foi "software R".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sepse foi confirmada pelas alterações do leucograma e da hemocultura crescente positiva em todos os pacus inoculados com *A. hydrophila* (Número de acesso / CP007518-2) e a hemocultura negativa grupo controle (Figura 1).

Figura 1. Quantificação bacteriana no sangue em pacu. C – Controle. HPI – horas após indução. UFC – unidade formadora de colônias.



Da análise das extensões sanguíneas dos pacus sépticos foram observados linfócitos, monócitos, granulócitos (neutrófilos e célula granulocítica especial), trombócitos e eosinófilos (Figura 2). No entanto, os eosinófilos não foram contabilizados, pois foram encontrados apenas em 4 animais de grupos variados. Em todas as extensões analisadas não foram encontrados basófilos. Esses dados corroboram com os encontrados em pacus septicêmicos (CLAUDIANO et al., 2019) e em tilápias desafiadas com *Streptococcus agalactiae* (YUNIS-AGUINAGA et al., 2016).

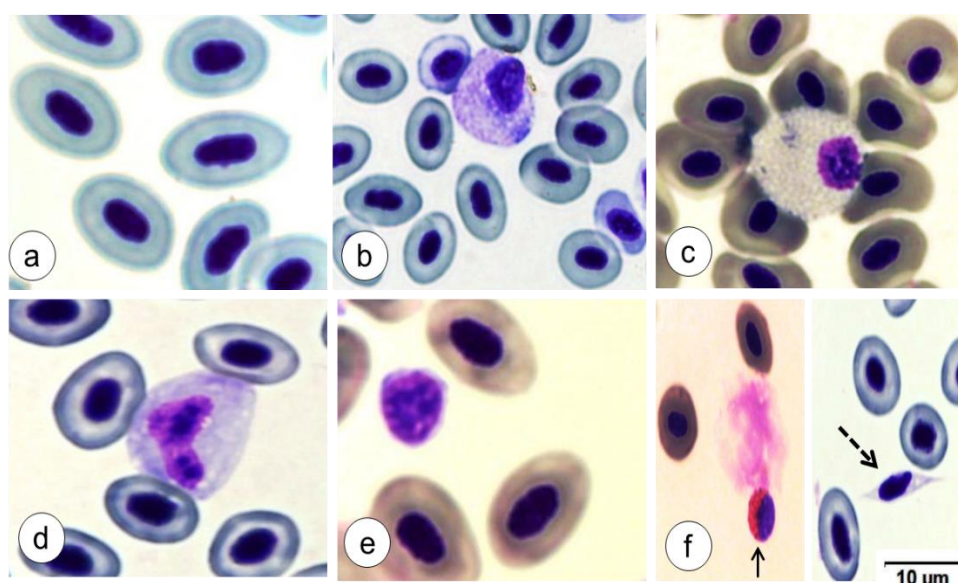
Verificou-se que a inoculação de *A. hydrophila* em pacus induziu aumento significativa ($p < 0,05$ / Tabela 1) dos leucócitos nos tempos mais tardios, 9 e 6 HPI comparado ao grupo controle. Esses dados diferem do encontrado para a mesma espécie na contagem pelo método direto, na qual verificou-se um leucopenia durante aeromonose (CLAUDIANO et al., 2019). Essa divergência evidencia a necessidade da padronização de um método de contagem para teleósteos, para melhora nos diagnósticos e prognósticos das doenças infecciosas.

Na tabela 1 demonstra-se a contagem dos leucócitos sanguíneos durante a sepse em *P. mesopotamicus* pelo método indireto, observando predominância de linfócitos seguidos de monócitos e neutrófilos em todos os tempos e no controle, semelhante ao

observado em diversas espécies de teleósteos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; YUNIS-AGUINAGA et al., 2015;

YUNIS-AGUINAGA et al., 2016; CLAUDIANO et al., 2019).

Figura 2. Células sanguíneas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Eritrócitos (a); neutrófilo (b); Célula granulocítica especial (c); monócito (d); linfócito (e); eosinófilo (f – seta) e trombócito (f – ponta das setas pontilhada). Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra= 10 µm



Nas extensões sanguíneas verificou-se, ainda, linfopenia ($p < 0,05$ / 3 HPI) em relação ao grupo controle, com granulocitose e monocitose ($p < 0,05$) com o aumento da infecção (6 e 9 HPI). O consumo dos trombócitos ($p < 0,05$) induzida pela infecção 3 HPI parece ser uma característica da sepse indiferente do método de contagem, pois essas alterações foram evidenciadas na mesma espécie septicêmicos pelo método direto (CLAUDIANO et al.,

2019). Esse consumo pode ser explicado, em parte, pelo consumo destas células pela coagulação intravascular disseminada que acompanha a sepse (TAVARES-DIAS; OLIVEIRA, 2009), evidenciado pelos distúrbios hemorrágicos na superfície corporal na aeromonose em pacu (MARINHO-NETO et al., 2019), e / ou pelo aumento destas células no exsudato inflamatório (CLAUDIANO et al., 2013).

Tabela 1. Valores médios ¹ (respectivos desvios padrão) e análise de variância para leucograma em *P. Mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*.

Tratamentos					
Variáveis	Controle	1 HPI	3 PHI	6 HPI	9 HPI
Lt (×103/μL)	1,53±0,30 B	1,71 ± 0,43 AB	1,77 ± 0,27 AB	1,80 ± 0,28 A	1,99 ± 0,45 A
Lf (×103/μL)	0,41± 0,09 A	0,42 ±0,14 AB	0,42 ± 0,07 B	0,42 ± 0,09 AB	0,49 ± 0,15 AB
Gn (×103/μL)	0,11±0,04 C	0,18 ± 0,06 B	0,22 ± 0,06 AB	0,26 ± 0,04 A	0,28 ± 0,06 A
Mn (×103/μL)	0,01±0,01 C	0,04 ± 0,02 B	0,08 ± 0,03 A	0,10 ± 0,03 A	0,09 ± 0,03 A
Tb (×103/μL)	2,30 ± 0,29 A	1,96 ± 0,56 AB	1,81 ± 0,24 B	1,79 ± 0,43 B	1,82 ± 0,16 B
Eritrócitos	159,20 ± 18,30 A	154,9 ± 28,45 A	142,30 ± 12,29 A	149,70 ± 29,19 A	158,80 ± 20,77 A

¹Médias (n=50) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05). ²Letra maiúscula comparam na linha os diferentes tratamentos. Leucócitos Totais (Lt), Linfócitos (Lf), Granulócitos (Gn), Monócitos (Mn), Trombócitos (Tb) e Horas Pós-Indução (HPI).

As alterações morfológicas identificadas nos eritrócitos, leucócitos e trombócitos nas extensões sanguíneas mais comuns, foram: basófilia, alterações tóxicas e vacuolização. Essas alterações, estão associadas com a resposta inflamatória aguda (THRALL et al., 2012), hemocultura positiva (SALGADO et al., 2007) e aumento da atividade dos neutrófilos (BERNSTEIN et al., 2001; AIRD, 2003).

Na análise semiquantitativa dos leucócitos verificou-se, de modo geral, moderada basófila crescente em leucócitos nos tempos de 6 a 9 HPI, se comparado ao grupo controle. Nos linfócitos notou-se intensa basófila no

tempo de 9 HPI, e nos trombócitos nos tempos finais, 3 a 9 HPI (Tabela 2). A alteração tóxica permaneceu moderada em granulócitos nos tempos de 3 a 9 HPI. Em trombócitos pode-se notar intensa basófila no tempo de 9 PHI; em monócitos não houve nenhuma alteração tóxica igualando-se ao grupo controle, conforme a (Tabela 2).

Ainda na Tabela 2, pode-se observar intensa vacuolização citoplasmática em trombócitos nos tempos de 3 a 9 HPI em relação ao grupo controle, nestes tempos nota-se moderada vacuolização em granulócitos, o mesmo foi verificado em linfócitos nos tempos de 1 a 9 HPI. Em monócito constatou-se vacuolização citoplasmática leve a partir de 3 HPI.

Tabela 2. Valores médios¹ e análise semiquantitativa para alterações morfológicas em Leucócitos e trombócitos de *P. mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*.

Parâmetros	Alterações	Grupos				
		Controle	1HPI	3HPI	6HPI	9HPI
Basófilia	Monócitos	0,3(zero)	2,6(zero)	6,3(1+)	9,7(1+)	9,3(1+)
	Linfócitos	11,3(2+)	16,3(2+)	22(2+)	28,3(2+)	30,7(3+)
	Granulócitos	4(zero)	8(1+)	15,7(2+)	17(2+)	19,7(2+)
	Trombócitos	22,7(2+)	24(2+)	39,7(3+)	34(3+)	47(3+)
	Monócitos	0(zero)	0,7(zero)	2(zero)	4(zero)	4(zero)
Alterações Tóxicas	Linfócitos	1,3(zero)	5(1+)	9(1+)	13,3(2+)	16(2+)
	Granulócitos	0,3(zero)	1,3(zero)	6(1+)	8,3(1+)	9,3(2+)
Vacuolização Citoplasmática	Monócitos	0(zero)	2(zero)	5,3(1+)	8(1+)	8(1+)
	Linfócitos	8,7(1+)	16,3(2+)	18,7(2+)	28(2+)	29,7(2+)
	Granulócitos	4(zero)	7,7(1+)	15,7(2+)	17,7(2+)	19(2+)
	Trombócitos	23(2+)	29,7(2+)	43(3+)	38,7(3+)	53(3+)

¹Médias (n=50) determina o grau semiquantitativo das alterações morfológicas em granulócitos, monócitos, linfócitos e trombócitos: < 5 (zero); Leve (1 +/- 5-10%); Moderado (2 +/- 10-30%); Intensa (3 +/- > 30%). Teste de Tukey (p<0,05).

No presente estudo, observou-se que a evolução da sepse nos pacus induz aumento das alterações morfológicas nos leucócitos. A ocorrência de alterações morfológicas em leucócitos, também, foi evidenciada em kinguio, *Carassius auratus*, com septicemia hemorrágica bacteriana (PÁDUA et al., 2010). O mesmo foi observado em *Piaractus mesopotamicus* infestados por *Piscinoodinium pillulare* e *Anacanthorus penilabiatus* (TAVARES-DIAS et al., 2008).

De acordo com Ranzani-Paiva e Silva-Solza (2004) a ocorrência de neutrófilos tóxicos pode estar relacionada com a liberação de neutrófilos imaturos para a circulação. Isso ocorre devido as células estarem

sendo produzidas de forma acelerada pelos órgãos hematopoiéticos, atuando como parte do mecanismo de defesa da resposta inflamatória à infecção instalada (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Esse fenômeno pode explicar a leucocitose evidenciado nos tempos de 3 a 9 HPI num quadro de aeromonose crescente (Figura 1) e a quantidade significativa de leucócitos imaturas na circulação.

Todos as variáveis analisadas neste trabalho não só ajudaram na compreensão desta doença complexa, mas também fornecem dados para projetar diagnósticos e prognóstico para medidas terapêuticas e profiláticas que possam minimizar a mortalidade pela sepse em peixes.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem sugerir que a inoculação de *A. hydrophila* via celomática em *P. mesopotamicus* provocou leucocitose e trombocitopenia, com graves alterações morfológicas crescentes com intensa basófilia, alterações tóxicas e vacuolização nas células sanguíneas.

AGRADECIMENTOS

Este estudo contou com o apoio da Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2014/10231-2 e 2011/20280-2) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (441054/2014-5). Ao meu grande amigo e mentor Prof^o Dr. Flávio Ruas de Moraes.

REFERÊNCIAS

- ABEYTA JÚNIOR, C.; KAYSNER, C. A.; WEKELL, M. M. Incidence of motile aeromonads from United States west coast shellfish growing estuaries, **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 849-855, 1990. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.10.849>.
- AIRD, W.C. The hematologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis. **Mayo Clinical Procedures**, v.78, n.7, p.869-81, 2003.
- B.C. SILVA; J.L.P. MOURIÑO; F.N. VIEIRA; A. JATOBÁ; W.Q. SEIFFERT; M.L. MARTINS. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**. v. 43, p. 908–916. 2012.
- BERNARD, J.; LEVY, J.P.; VARETI, B.; CLAUVEL, J.P.; RAIN, J.D.; SULTAN, Y. **Hematologia**. São Paulo: Editora Medsi, 2000. 300p.
- BERNSTEIN, H. M.; POLLOCK, B. H.; CALHON, D. A.; CHRISTENSEN, R. D. Administration of re combinant granulocyte colony-stimulating factor to neonates with septicemia: a meta-analysis, **Journal of Pediatrics**, v. 138, p. 917-20, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1067/mpd.2001.114014>.
- CHOPRA, A. K.; GRAF, J.; HOMEAN, A. J.; JOHNSON, J. A. Virulence factor–activity relationships (VFAR) with specific emphasis on *Aeromonas* species (spp.). **Journal of water and health**, 2009, V. 7, p. 29-54. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.053>.
- CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; MARCUSSO, P.F.; Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 4, p. 01-06, 2013.
- CLAUDIANO, G. S.; ANDRADE, S. C. S.; SOUZA, E. C.; YUNIS-AGUINAGA, J.; COUTINHO, L. L.; MOREIRA, D. K.T.; GONÇALVES, F. C.; MUNDIM, A. V.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.;

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Role of neuroendocrine modulation and biochemistry in the sepsis in *Piaractus mesopotamicus*. **General and Comparative Endocrinology**, 2020, 288, 113338.

CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; MARINHO-NETO, F. A.; MIRANDA, R. L.; MARTINS, I. M.; OTANI, F. S.; MUNDIM, A.V.; MARZOCCHI-MACHADO C. M.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. **Fish & shellfish immunology**, v. 88, p. 259-265.2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.044>.

Da SILVA; B.C. **Septicemia hemorrágica em surubim híbrido (*Pseudoplatstoma corruscans* macho x *P. fasciatum* fêmea) causada pela *Aeromonas hydrophila***. 2010. 62 f. Dissertação (Mestre em Aquicultura) – Universidade do Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

DIAS, M. K. R.; SAMPAIO, L. S.; PROIETTI-JUNIOR, A. A.; YOSHIOKA, E.T.; D.P. RODRIGUES; RODRIGUEZ, A. F.; RIBEIROE, R. A.; FARIAE, F. S. E. D.V.; OZÓRIO, R. O. A.; TAVARES-DIAS, M. Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae); the giant fish from Amazon. **Veterinary Microbiology**, v. 188, p. 12-15. 2016.

FUNKE, A.; BERNER, R.; TRACHEL, B.; SCHMEISSER, D.; LEITITIS, J. U.; NIEMEYER C. M. Frequency; natural

course; and outcome of neonatal neutropenia. **Pediatrics**, 2000, v. 1, p. 45-51.

GARCIA, F.; MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, p. 1:17-21, 2009. Doi: <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v31il.308>.

HELLER, A.R.; GROTH, G.; HELLER, S.C. N-acetylcystein reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. **Critical Care Medicine**. V. 29, p. 272-6, 2002.

ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p. 54-63, 2008.

M. POPOFF, Genus III *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936 398AL, in: N.R. Krieg, J.G. Holt (Eds.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1984, v. 1, p. 545-548.

MARINHO-NETO, F. A.; CLAUDIANO, G. S.; YUNIS-AGUINAGA, J.; CUEVA-QUIROZ, V. A.; KOBASHIGAWA, K. K.; CRUZ, N. R.; MORAES, J. R. Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. **PLoS one**, V. 14, n. 9, 2019. Doi:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222626>.

PÁDUA, S. B.; PILARSKI, F.; NETO, J. D.; ISHIKAWA, M. M.; SATAKE, F.; DIAS, M. T. Distúrbio morfológicos em leucócitos de exemplar de Kinguio (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758) com septicemia hemorrágica bacteriana: relato de caso. **Revista Brasileira Clínica Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 16-20. 2010

RANZANI-PAIVA, M. J.T.; PÁDUA, S. B. De.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. 2013. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013, 140p.

RANZANI-PAIVA, M. J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. **Hematologia de peixes brasileiros**. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela, 2004, p. 89-120.

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

SALGADO, R. G. C.; OLIVEIRA, M. F. P.; SANTOS, E. J. M.; BRITO JUNIOR, L. C. Importância da presença de granulações tóxicas para o diagnóstico hematológico de septicemia, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 373-377, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-848420070004000>.

Tavares-Dias, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá. 2009.

TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F. R. Hematological characteristics of brazilian teleosts. iv. parameters of matrinxã (*Brycon cephalus* günther, 1869), **Ars Veterinaria**, v.15, p. 149-153, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematology of teleosts fish**. 1. ed.: Villimpress, Ribeirão Preto. 2004, 144p. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb02351.x>.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 1, p. 49-54, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M. L. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, **Brazil Boletim. Instituto de Pesca**, v. 34, p. 189-196, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A. A.; MARCON, J.L. Methodological limitations of counting total leukocytes and thrombocytes in reptiles (Amazon turtle, *Podocnemis expansa*): an analysis and discussion. **Acta Amazonica**, v. 38, n 2, p. 351-356, 2008.

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**, second ed., Wiley-Black well, 2012.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS 222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 27, p. 909-914, 1970. Doi: <https://doi.org/10.1139/I70-097>.

YUNIS-AGUINAGA J., FERNANDES D.C., ETO S.F., CLAUDIANO G.S., MARCUSSO P.F., MARINHO-NETO F.A., FERNANDES J.B.K., MORAES F.R. & MORAES J.R.E. 2016. Dietary camu camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. **Fish & shellfish immunology**, v. 58, p. 284-291, 2016. DOI:10.1016/j.fsi.2016.08.030.

YUNIS-AGUINAGA, J.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSSO, P. F.; MANRIQUE, W. G.; MORAES, J. R.; MORAES, F. R.; FERNANDES, J. B. *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity

in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. **Fish & shellfish immunology**, v. 47, n. 1, p. 630-638, 2015, DOI:10.1016/j.fsi.2015.09.051.

ZAHOREC, R. Ratio of neutrophil to lymphocyte cause – rapid and simple parameter of systemic inflammation and distress in critically ill. **Bratislava Medical Journal**, v. 102, p. 5-14, 2001.

ZHANG, D.; XU, D. H.; SHOEMAKER, C. Experimental induction of motile *Aeromonas* septicemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 18–23, 2016.