

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Análise hematológica, histopatológica renal e de água em experimento de
exposição crônica de tilápias *Oreochromis niloticus* à amoxicilina**

Iara Pâmela Vasconcelos Martins Cristo
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

IARA PÂMELA VASCONCELOS MARTINS CRISTO

Análise hematológica, histopatológica renal e de água em experimento de exposição crônica de tilápias *Oreochromis niloticus* à amoxicilina

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Laercio dos Anjos Benjamin

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

C933a
2024
Cristo, Iara Pâmela Vasconcelos Martins, 1995-
Análise hematológica, histopatológica renal e de água em
experimento de exposição crônica de tilápias (*Oreochromis
niloticus*) à amoxicilina / Iara Pâmela Vasconcelos Martins
Cristo. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (52 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: f. 36-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.782>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Tilápia (Peixe) - Histopatologia. 2. Hematologia
veterinária. 3. Amoxicilina - Toxicologia. 4. Água -
Contaminação. I. Benjamin, Laércio dos Anjos, 1963-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.0891815

IARA PÂMELA VASCONCELOS MARTINS CRISTO

Análise hematológica, histopatológica renal e de água em experimento de exposição crônica de tilápias *Oreochromis niloticus* à amoxicilina

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de agosto de 2024.

Assentimento:

Iara Pâmela Vasconcelos Martins Cristo
Autora

Laercio dos Anjos Benjamin
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 20/01/2025 às 20:41:12 e pelo orientador em 29/01/2025 às 16:16:34. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **9LOE.IKWO.G0II** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço à Deus em primeiro lugar, por nunca me deixar desistir e me manter forte diante de todos os obstáculos e provações.

À Universidade Federal de Viçosa por permitir a realização desse experimento, em especial ao Departamento de Veterinária.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos por um período.

Ao meu orientador e professor Laércio dos Anjos Benjamin, pela grande receptividade, acolhimento e amizade construída ao longo desses anos e pela imensa atenção, orientação, paciência e dedicação com esse trabalho. Minha sincera gratidão por agregar tanto ao meu aprendizado e por estar sempre presente em todos os momentos, de alegria e dificuldades, onde contornamos todas elas juntos com muita sabedoria e paciência. Obrigada por fazer parte da minha vida e por me mostrar sempre que o caminho da verdade e da sabedoria são os caminhos certos. Tenho muito orgulho de ser sua orientada e de dividir as coisas da vida em nossas conversas, sempre com um cafezinho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia de Peixes, em especial, Fred, Joana, Mariana, Artur e Vithoria, que participaram ativamente dessa pesquisa, auxiliando nas análises e proporcionando momentos de descontração.

À todos os colaboradores e laboratórios da UFV que permitiram a realização das análises e contribuíram grandemente com meu aprendizado: Laboratório de Biologia de Peixes (LBP), Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária (LPPCV), Laboratório de Histopatologia, Laboratório de Anatomia Veterinária, Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental (LESA) juntamente com a professora Ann Mounter e Priscila que foram essenciais para a definição de alguns tópicos e realização dos mesmos. Aos colaboradores Alex Matias e Nívia do Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC) por todo auxílio durante as análises, bem como a utilização dos equipamentos, e à todos os funcionários do Departamento de Veterinária pela disponibilidade, atenção e dedicação com as etapas dessa pesquisa.

À Piscicultura da Prata, pela cessão dos peixes utilizados nesta pesquisa, e toda atenção conosco.

Aos amigos Glaura Molinari, Gabriela Rabelo, Paula Ferreira, Joana Brioschi, Gabrielle Soares, João Victor Gonçalves, Heloísio Castro, que estiveram presentes contribuindo com o manejo, análises, coleta de

amostras e processamento de material, a minha eterna gratidão. E também aos amigos Junnia Pena, Raphaela Andrade, Letícia Gomes, João Vitor Silva, Letícia Ottoni, Letícia Rodrigues, Priscila Soares, Ana Carolina Gandra, Stephany Peres, Bárbara Nascimento, Raphella Totino e demais que de alguma forma se fizeram presentes, com muito apoio, incentivo e companheirismo.

Em especial à Natália Brioschi, por estar presente em todos os momentos, auxiliando imensamente nesta pesquisa, apoiando, incentivando, dividindo alegrias e dando conforto nos momentos difíceis. Sou grata por dividir minha rotina com você, por ter você em minha vida e por reconhecer que hoje sou um ser humano e uma profissional melhor.

Aos amigos e colegas de trabalho do Hospital Veterinário Univiçosa e da Faculdade Sudamérica, pelo suporte, carinho e apoio.

À minha família, que nunca mediu esforços para ajudar e me apoiar em todas as decisões, fazendo com que eu soubesse que sempre posso contar com cada um e que minha felicidade e bem-estar está à frente de qualquer coisa. À minha mãe Gabriela, que sempre se dedicou para me proporcionar as melhores coisas da vida, sendo mãe e pai incansavelmente, me mostrando que o amor de uma mãe é capaz de mudar todas as coisas e capaz de enfrentar barreiras que muitas vezes parecem impossíveis. À minha vó Maria das Graças, minha grande inspiração e também professora, que me ensina todos os dias com maestria como a busca pelo conhecimento e a ética são importantes para nosso crescimento, você é meu espelho e meu orgulho de ter trilhado seu caminho. Ao meu irmão Marcos Gabriel, por me dar tanto carinho e aconchego, você é o meu maior amor da vida. À minha tia Graziela, Pedro, Rafael e Rodolfo, obrigada por acreditarem nas minhas escolhas, por estarem sempre presentes e pelo grande apoio em toda essa jornada.

Em memória do meu avô e pai Arcanjo Gabriel, que mostrou seu apoio pela minha caminhada até o último minuto, esteve presente em todos os momentos importantes da minha vida, me criou, educou, e me mostrou que para ser pai basta se fazer presente e distribuir amor. Você sempre será meu anjo da guarda e a luz que me guia.

Ao meu “filho” Zac, pelo carinho, companheirismo e conforto. Você sempre soube me acalmar e me fazer companhia nos momentos que eu mais precisei. Você cuida de mim e eu de você.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e principalmente por contribuírem tanto com essa pesquisa. À Joana que me agregou muito conhecimento sobre a espécie, sobre a condução do experimento, esclareceu dúvidas diversas vezes e sempre esteve presente e disponível durante todas as etapas. Te agradeço pela paciência, apoio, disponibilidade, atenção e por todo envolvimento neste trabalho, do fundo

do coração. Ao membro da banca, professor e amigo João Paulo Machado, por estar presente em minha vida acadêmica desde o início de tudo, sendo minha grande inspiração e meu maior incentivador na busca pelo conhecimento. Agradeço pela participação nesta pesquisa, pelo auxílio nas coletas, por esclarecer minhas dúvidas e por me tranquilizar diante de tantas dificuldades, falando sempre que eu sou capaz. Você é de longe uma pessoa que eu me orgulho muito de ter conhecido e que vou levar para a vida inteira.

RESUMO

CRISTO, Iara Pâmela Vasconcelos Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Análise hematológica, histopatológica renal e de água em experimento de exposição crônica de tilápias *Oreochromis niloticus* à amoxicilina.** Orientador: Laercio dos Anjos Benjamin.

O conhecimento sobre tilápia (*Oreochromis niloticus*) e a exposição ao antibiótico amoxicilina é de grande importância, pois pouco se sabe sobre seus efeitos, tendo em vista que a maioria dos estudos são com estresse e exposição a tóxicos, esse trabalho se torna fonte de informação para estudo de outras espécies, visto que há grande variedade no consumo humano. A exposição à amoxicilina fornece informações sobre a interferência na homeostasia renal quanto ao tratamento de peixes, sendo a via urinária a única via de excreção do antibiótico, e também quanto ao descarte inadequado do antibiótico, uma vez que pode afetar diretamente o consumo humano de peixe e de água. O objetivo desse trabalho foi avaliar a histopatologia renal e hematologia de tilápias (*Oreochromis niloticus*), comparando os resultados entre os grupos expostos e controle, bem como classificar afecções renais de peixes de acordo com alterações estruturais, em ensaio crônico. Foram averiguados diariamente parâmetros físico-químicos da água, como oxigenação, pH, temperatura, nitrito, nitrato e amônia garantindo boas condições aos peixes até o momento da eutanásia. Foram confeccionadas lâminas histológicas após emblocamento de fragmentos de rim em historesina, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina, seguidas de avaliação histológica e histopatológica. Foi utilizado um software para obtenção de fotomicrografias utilizando-se ampliações de 40x para classificação patológica de grau. Os valores obtidos dos parâmetros da qualidade da água e hematológicos foram submetidos à análise estatística dos parâmetros estudados. Foi evidenciado neste estudo que a exposição crônica de tilápias do Nilo à amoxicilina resulta em alterações hematológicas e histológicas para a espécie.

Palavras-chave: antibiótico; ecotoxicologia; histologia; penicilinas; rim.

ABSTRACT

CRISTO, Iara Pâmela Vasconcelos Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **Hematology, kidney histopathology and water analysis in an experiment involving chronic exposure of tilapia *Oreochromis niloticus* to amoxicillin.** Adviser: Laercio dos Anjos Benjamin.

Knowledge about tilapia (*Oreochromis niloticus*) and exposure to the antibiotic amoxicillin is of great importance, since little is known about its effects. Considering that most studies involve stress and exposure to toxic substances, this work becomes a source of information for the study of other species, since there is a great variety in human consumption. Exposure to amoxicillin provides information about the interference in renal homeostasis regarding the treatment of fish, with the urinary tract being the only route of excretion of the antibiotic, and also regarding the inadequate disposal of the antibiotic, since it can directly affect human consumption of fish and water. The objective of this study was to evaluate the renal histopathology and hematology of tilapia (*Oreochromis niloticus*), comparing the results between the exposed and control groups, as well as classifying renal diseases of fish according to structural alterations, in a chronic assay. The physical and chemical parameters of the water, such as oxygenation, pH, temperature, nitrite, nitrate and ammonia, were checked daily, ensuring good conditions for the fish until euthanasia. Histological slides were prepared after embedding kidney fragments in historesin, which were stained with hematoxylin and eosin, followed by histological and histopathological evaluation. A software was used to obtain photomicrographs using 40x magnifications for pathological grade classification. The values obtained for the water quality and hematological parameters were subjected to statistical analysis of the parameters studied. It was evidenced in this study that chronic exposure of Nile tilapia to amoxicillin results in hematological and histological changes for the species.

Keywords: antibiotic; ecotoxicology; histology; kidney; penicillins.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das alterações histológicas do rim quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, modificado de Poleksić & Mitrović-Tutundžić (1994)	25
Tabela 2 - Médias dos parâmetros da qualidade da água nas exposições à amoxicilina e grupo controle	29
Tabela 3 - Médias e coeficiente de variação dos compostos nitrogenados da água por concentração de exposição e grupo controle	30
Tabela 4 - Eritrograma de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas a diferentes concentrações de amoxicilina e grupo controle	34
Tabela 5 - Leucograma de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostas a diferentes concentrações de amoxicilina e grupo controle	35
Tabela 6 - Classificação de alterações histológicas de cada concentração de acordo com o grau	36

APÊNDICE A

Tabela 1 - Intervalos de referência de hematologia para tilápias	52
Tabela 2 - Intervalos de referência de leucograma para tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>)	52

APÊNDICE B

Tabela - Teste de Tukey para temperatura, oxigênio dissolvido e pH	53
Tabela – Teste de ANOVA para leucócitos	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Espécie de estudo – a tilápia do Nilo.....	14
2.2. Estrutura e histologia do rim de tilápia.....	16
2.3. Fármaco de utilização: a amoxicilina.....	17
2.4. Análise da água.....	18
2.5. Hematologia.....	19
2.6. Histopatologia renal.....	20
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. CEUA.....	21
4.2. Ensaio experimental.....	22
4.3. Análise da água.....	23
4.4. Processamento histológico das amostras.....	24
4.5. Coloração das lâminas.....	24
4.6. Avaliação histológica e histopatológica.....	25
4.7. Análises hematológicas.....	26
4.8. Hematócrito e hemoglobina.....	26
4.9. Índices hematimétricos.....	27
4.10. Análise de dados.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1. Análise de água.....	28
5.1.1. Parâmetros físicos.....	28
5.1.2. Compostos nitrogenados na água.....	30
5.2. Análise hematológica.....	32
5.3. Análise histopatológica.....	35
5.4. Panorama sobre antibiótico residual na água.....	36
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, a qualidade do ambiente que os organismos vivos habitavam eram avaliadas quanto às respostas dos mesmos a diferentes tipos de estresse. Há relatos de que Aristóteles (384-322 a.C.), expôs peixes de água doce à água do mar, para estudar as suas reações. O primeiro teste toxicológico com organismos aquáticos relatado foi realizado em 1816 com insetos aquáticos (Buikema e Voshell, 1993).

Os produtos farmacêuticos são desenvolvidos e utilizados para auxiliar no aumento e melhora da qualidade e expectativa de vida de humanos e animais; porém, esses compostos presentes no meio ambiente são considerados contaminantes emergentes devido à indução de toxicidade sobre a biota (Leung *et al.*, 2013). Resíduos de antibióticos, anti-inflamatórios e hormônios têm sido encontrados em águas residuais, sendo elas domésticas, subterrâneas, superficiais, e também na água potável em diversos países. Apesar de serem encontrados em baixas concentrações, na faixa de nanograma ou micrograma por litro (ng/L a µg/L), a sua presença nos recursos hídricos é uma preocupação crescente devido aos riscos para organismos aquáticos e também para a saúde humana (Iria, 2018).

Os antibióticos amoxicilina, cefalexina, azitromicina, trimetoprim, sulfametoxazol e tetraciclina são os mais utilizados no Brasil, e também estão incluídos na lista de compostos selecionados para avaliação de risco. Segundo Castro *et al.* (2014), esses antibióticos representaram 96,5% das vendas dos 10 antibióticos mais consumidos entre os anos de 2013 e 2016.

Exposição crônica a traços de níveis de misturas farmacêuticas podem ser substanciais e podem constituir em possíveis ameaças ao ambiente aquático (Fent *et al.*, 2006) e para a saúde humana, com possível efeito como resistência a antibióticos (Qiao *et al.*, 2018; Sabri *et al.*, 2018) e condições desreguladoras endócrinas (Fent *et al.*, 2006).

A amoxicilina tem ação dependente de sua capacidade de alcançar e se ligar a proteínas de ligação à penicilina, que se localizam na membrana interna da parede celular bacteriana. Ela funciona contra um amplo espectro de microrganismos gram-positivos e gram-negativos. É por isso que frequentemente é

utilizada como o primeiro fármaco em infecções, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (Calvo e Martínez, 2009).

Os peixes são usados na alimentação humana e, devido ao seu potencial de acumular poluentes presentes na coluna d'água, bem como por meio da biomagnificação pela cadeia trófica, representam importante via de contaminação para populações humanas (Oliveira *et al.*, 2006). Além disso, esses animais caracterizam-se pela grande sensibilidade aos poluentes de origem antrópica (Oliveira e Bennemann, 2005). Os vários poluentes presentes na água e no sedimento dos ambientes podem causar diversas alterações morfológicas em tecidos dos peixes, como brânquias e fígado (Sousa *et al.*, 2013, p.369-376).

A histologia é uma área de estudo da ciência que abrange a interrelação entre a integração de atividades moleculares e fisiológicas dos órgãos e seus tecidos, com estruturas anatômicas específicas e, conseqüentemente, exige um conhecimento visual. A pesquisa em fisiologia, química, imunologia e patologia, bem como as interações entre estas disciplinas, são fundamentais para o conhecimento acerca da biologia dos tecidos (Junqueira e Carneiro, 2004).

O estudo detalhado da disciplina de histologia possui grande relevância para o entendimento fisiológico até a patologia, já que permitem análises estruturais e funcionais dos órgãos. Então, qualquer alteração pode ser visualizada em nível celular. Banks (1992) relata que a histofisiologia dos tecidos e dos órgãos tem se expandido e ganhado aperfeiçoamento, e permanece de forma integrada às considerações estruturais. É extensa a aplicabilidade da histologia e da histofisiologia para a medicina veterinária. Além disso, é de grande importância para diagnósticos laboratoriais.

Nos peixes teleósteos, o rim é caracterizado por ser um órgão único, e desempenha um papel semelhante à função da medula óssea dos vertebrados superiores, onde tem função hematopoiética, juntamente com o baço. Ele é subdividido, em rim anterior e posterior, onde a função hematopoiética ocorre quase que exclusivamente na sua porção anterior. Sua região posterior é responsável por filtrar e excretar compostos tóxicos do sangue, exercendo função semelhante à do rim dos mamíferos (EMBRAPA Pesca e Agricultura, 2013).

O néfron é a unidade funcional do rim e varia muito em sua estrutura entre diferentes vertebrados. A formação de néfrons mostra um grau variável de diferenças entre as classes de animais. Nas aves, o rim possui dois tipos de néfrons: um é do tipo reptiliano e de pequeno porte, sem alças de Henle; em outras é do tipo mamífero, grande em tamanho com comprimento longo ou intermediário. Em contraste, o processo morfológico dos podócitos em desenvolvimento foi

relatado no rim clássico de humanos, cavalo, cabra, macaco, coelho, gato, cachorro, galinha, peixe medaka, rato e cobaia, indicando que seriam um bom modelo para estudar a regeneração renal (Maurya *et al.*, 2018).

Observa-se que a taxa de filtração glomerular corresponde à soma da taxa de filtração de cada néfron funcional, e representa um índice da função de toda a região renal; sendo assim, é um indicador específico e sensível de disfunções renais primárias, fornecendo informações sobre a gravidade e prognóstico de doença renal (Schuster e Selding, 1985; Krawiec *et al.*, 1988; Fein *et al.*, 2006).

O sangue é constituído por um líquido, o plasma, que conduz diversas células que possuem diferentes atividades. Origina-se principalmente no timo, no fígado, no baço e no intestino, e é o responsável por levar aos tecidos, hormônios e nutrientes que são importantes nas atividades metabólicas; também retiram dos tecidos o que não é útil (Satake *et al.*, 2009). O plasma conduz três células distintas quanto às suas funções: os leucócitos, os trombócitos e os eritrócitos (Drumond *et al.*, 2010; Satake *et al.*, 2009; Zavala–Camin, 2004, 326p.).

Os eritrócitos, são as células em maior quantidade na circulação sanguínea, são nucleados nos peixes e transportam oxigênio e gás carbônico. Pode-se notar variações morfológicas nestas células em diferentes espécies de peixes. Geralmente os eritrócitos são elípticos, com núcleo central, exibem cromatina compacta nas células maduras e, nos eritroblastos, a cromatina é frouxa (Ranzani-Paiva *et al.*, 1998; Ranzani-Paiva *et al.*, 2013, 124p.).

Os leucócitos são as células de defesa e podem ser utilizados para avaliar o sistema imunológico. São classificados como monócitos (principais fagócitos dos peixes), linfócitos (os mais abundantes e são responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos e resposta imune), neutrófilos (defesa contra bactérias), eosinófilos (defesa contra parasitas) e basófilos (participam do processo fagocitário). Já os trombócitos estão relacionados com a coagulação sanguínea, com a defesa orgânica e com função fagocitária (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013, 124p.).

Assim sendo, se torna importante a avaliação da estrutura renal e do perfil hematológico animal a fim de se trazer resultados pertinentes à exposição crônica à amoxicilina, bem como identificar e conscientizar sobre o descarte ambiental e possíveis danos à saúde humana e animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espécie de estudo - a tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758), é uma espécie de peixe de água doce de grande importância, que naturalmente é encontrada nos rios da costa de Israel e da África (El Sayed, 2006) e está entre os animais aquáticos mais cultivados do mundo (Fao 2018).

Foi introduzida em vários países para a piscicultura comercial, e chegou ao Brasil na década de 1970 (Watanabe *et al.*, 2002), estima-se que a cultura da espécie esteja presente e movimente a economia de 135 países no mundo (Fao, 2018).

A importância da criação das tilápias na piscicultura brasileira está relacionada com características fisiológicas que a espécie apresenta, incluindo a tolerância em variações climáticas, sua adaptabilidade a diferentes salinidades, variação de oxigenação da água, superpopulação, alta resistência às doenças e infecções (El Sayed, 2006), e também se destaca pela grande adesão dos consumidores brasileiros referente ao seu sabor.

Segundo o anuário de 2024 da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR), a tilápia representa 65,3% da produção nacional e o consumo praticamente dobrou em uma década.

A tilápia ampliou consideravelmente a participação na produção brasileira de peixes de cultivo, em 2023, com 579.080 toneladas, um crescimento de 5,28% em relação ao ano anterior, conforme demonstra levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR). Em 2023, o país colocou no mercado 550.060 toneladas (63,93% do total) (Anuário 2024 Peixe BR).

O Paraná lidera o cultivo de tilápia no país, com 209.500 toneladas, constata a Peixe BR (2024). A produção no estado cresceu 11,5% em relação a 2022 (187.800 toneladas). Em seguida vem São Paulo (75.700) toneladas, mas a produção local caiu 2% em 2023. Entre os cinco maiores estados produtores, destaque para Minas Gerais (58.200 toneladas), que teve aumento de 12,6%. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápia, atrás de China, Indonésia e Egito (Anuário 2024 Peixe BR da Piscicultura).

Os peixes de cultivo, liderados pela tilápia, mas com a essencial contribuição dos nativos, como o tambaqui e seus híbridos, tornaram-se cada vez mais presentes na alimentação dos brasileiros. Tomando como referência a última década (2014 a 2023), período em que a Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR) atua no fomento, valorização e defesa da produção nacional, a oferta de peixes de cultivo cresceu 53%, saindo de 579 mil toneladas (2014) para 887 mil toneladas (2023). No mesmo período, as demais proteínas cresceram, exceto a carne bovina; porém, bem menos que a tilápia. Em termos de produção, as que mais avançaram foram a carne suína (+48,6%) e os ovos (+55,9%) (Peixe BR, 2024).

2.2. Estrutura e histologia do rim da tilápia

Os rins dos peixes teleósteos adultos ficam localizados na região dorsal da cavidade abdominal, dorsal à bexiga natatória, desempenhando papel semelhante ao da medula óssea dos vertebrados superiores, possuindo função hematopoética juntamente com o baço. São subdivididos em duas regiões com funções diferentes: porção anterior (principal órgão hematopoiético dos peixes) e porção posterior (responsável principalmente por filtrar e retirar compostos tóxicos do sangue, exercendo função similar à do rim dos mamíferos) (Moro *et al.*, 2013).

O rim em peixes teleósteos é formado por três segmentos com características morfológicas distintas: o rim cefálico, cranial, anterior ou pronefro; o rim médio, posterior ou mesonefro; e o rim caudal ou metanefro. O rim cefálico e o rim médio possuem capacidade hematopoiética; porém, o rim cefálico representa o compartimento de maior atividade. Em alguns peixes se observa no rim cefálico a presença de néfrons e ductos, estruturas responsáveis pela filtração (Safer *et al.*, 1982, Prodocimo e Freire, 2003) e remoção de compostos tóxicos do sangue, exercendo função similar à do rim dos mamíferos, enquanto em outros estas estruturas estão restritas somente ao rim médio e ao rim caudal (Weinreb, 1963, Cannon *et al.*, 1980, Zuasti e Ferrer, 1988).

Os rins atuam no metabolismo de compostos endógenos e exógenos, além de apresentarem níveis de lisozima, enzima que possui propriedades anti-inflamatórias e antivirais, e alto potencial de atividade bactericida ou bacteriolítica (Kiron, 2012).

O sistema excretor dos peixes é responsável por eliminar os resíduos do metabolismo e do alimento não digerido, como fezes, nitrogênio, sais, água e ureia. Dentre os compostos excretados, os nitrogenados são os mais tóxicos aos animais. Dependendo da disponibilidade de água do meio para diluir e excretar os compostos nitrogenados, eles são excretados de diferentes formas pelos diversos grupos de animais. A amônia é a forma mais tóxica delas e exige grandes quantidades de água para sua diluição, sendo a mais utilizada pelos peixes devido à disponibilidade de água que possuem em seu *habitat*. A ureia é menos tóxica que a amônia, sendo utilizada principalmente pelos mamíferos, ao passo que o ácido úrico é menos tóxico ainda, sendo o principal produto da excreção de aves e répteis (Moro *et al.*, 2013, p.71-95).

Quanto menor for a toxicidade do composto nitrogenado excretado pelo animal, maior será a energia gasta para produzi-lo. Dos produtos nitrogenados excretados pelos peixes, cerca de 70% estão na forma de amônia, liberada passivamente pelas brânquias para a água. Assim, por viverem em um ambiente onde a disponibilidade de água é suficientemente grande para diluir os compostos nitrogenados, os peixes gastam menos energia

para excretar esses metabólitos, o que permite que esses compostos sejam excretados na forma mais tóxica quando comparado com outros animais (Moro *et al.*, 2013, p.71-95).

Outro fator relevante relacionado à excreção dos peixes, é sua interação com a regulação osmótica. Os peixes de água doce tendem a “ganhar” água do meio ambiente por osmose. Por isso, os rins desses peixes filtram essa água e assim formam uma urina muito diluída (Moro *et al.*, 2013).

2.3. Farmacotoxicologia da amoxicilina

A amoxicilina é uma penicilina semissintética, bactericida, que inibe a síntese da parede celular bacteriana (Calvo e Martínez, 2009).

Um aspecto importante relacionado à intensificação dos sistemas de criação de peixes é o uso crescente de antimicrobianos na profilaxia e no tratamento de doenças, o que tem gerado um aumento global da resistência bacteriana a múltiplas drogas, inclusive entre as espécies de *Aeromonas* (Chaudhury *et al.*, 1996). A associação da múltipla resistência a diferentes antimicrobianos com a transferência horizontal potencial de genes de resistência entre bactérias filogeneticamente próximas ou não, é outra realidade preocupante (Rhodes *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001, p.5675-5692).

De acordo com Hirsch (2006), a resistência achada em isolados obtidos da superfície corpórea dos peixes e da água do tanque, pode ter sido derivada dos alevinos ou da ração, uma vez que não foi relatado o uso de antimicrobianos nas propriedades estudadas. Foi evidenciado que a diversidade de espécies de *Aeromonas* em ambientes de piscicultura é grande, e que diversos isolados se mostram resistentes a antibióticos, mesmo sem uso de tais substâncias para o controle de doenças infecciosas.

O influxo de antibióticos em ambientes aquáticos também sugere o perigo de propagação de bactérias resistentes a antibióticos e de genes de resistência a antibióticos (Akiba *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). Mesmo baixas concentrações de antibióticos, de nanogramas a microgramas por litro, podem produzir estirpes bacterianas resistentes a antibióticos que também ameaçam a saúde humana.

Com base no padrão de consumo e uso de antibióticos, os tipos e concentrações de antibióticos nos ambientes aquáticos medidos em diferentes regiões podem variar (Kolpin *et al.*, 2002). Os antibióticos também apresentam propriedades variadas em ambientes aquáticos, dependendo da sua estrutura química e estabilidade (Luo *et al.*, 2011). Os sedimentos e a salinidade do ambiente aquático são outros fatores que podem mitigar o acúmulo de antibióticos nos peixes (Chen *et al.*, 2017).

O uso de antibióticos não se limita ao uso humano, também se estende ao uso veterinário, e é amplamente aplicado na aquicultura e em pomares. A aquicultura é considerada uma indústria essencial para atender às necessidades de consumo humano de produtos pesqueiros.

Conseqüentemente, a quantidade de antibióticos utilizados na aquicultura está aumentando em todo o mundo (Liu *et al.*, 2017c; Miranda *et al.*, 2018). Métodos de triagem por espectrometria de massa de alta resolução foram desenvolvidos para detectar vários tipos de antibióticos em produtos da aquicultura (Turnipseed *et al.*, 2019).

É razoável levantar preocupações sobre o risco de exposição dos peixes aos produtos farmacêuticos, uma vez que podem ameaçar a saúde humana através da dieta. Alguns dados sugerem que os produtos farmacêuticos liberados em ambientes aquáticos podem representar um risco crônico para os peixes (Liu *et al.*, 2015) e podem causar alterações genéticas e histológicas nos tecidos dos peixes, mesmo em níveis de exposição ambiental.

Reichert *et al.* (2019), considerando publicações entre 2000 e 2019, revelaram que os antibióticos com maiores taxas de resistência bacteriana foram tetraciclina, amoxicilina, ampicilina, imipenem, gentamicina e cefalotina, frequentemente empregados para tratar e prevenir infecções. Segundo eles, as principais fontes de resistência aos antibióticos no Brasil são os resíduos ou águas residuais hospitalares, domésticas e agrícolas.

2.4. Análise da água

As características físicas e químicas da água de cultivo afetam fortemente a reprodução, o crescimento, a saúde e a sobrevivência dos peixes (Souza *et al.*, 2000).

A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas vigente, levando em consideração a qualidade da água definida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA - nº 357/2005, estabelece o intervalo de 6,0 a 9,0 para pH e um valor que não seja inferior a 6 mg/L de oxigênio dissolvido em águas doces de classe I.

O CO₂ também causa redução do pH da água pela formação do ácido carbônico (COOH⁻) e promove o desenvolvimento de algas fotossintéticas que o usam como fonte de carbono (nutriente) (Thomas, 2006).

A faixa ideal de pH da água para cultivo de peixes em viveiros vai de 6,5 a 9,0. Abaixo ou acima desses valores, há estresse e retardo no

crescimento animal. Quando o pH da água de cultivo está abaixo de 4,0 ou acima de 11,0, há risco de morte iminente dos animais (Boyd, 2000, p.330).

A temperatura é um fator que deve ser controlado diariamente, de acordo com as exigências da espécie e com a menor variação possível. A tilápia é uma espécie tropical, que apresenta conforto térmico entre 27°C a 32°C, pois temperaturas acima de 32 °C e abaixo de 27 °C reduzem o seu apetite e o seu crescimento. As temperaturas mínimas letais variam entre 8 a 13 °C, dependendo da adaptação. Com relação à temperatura máxima letal, essa pode variar de 38 °C a 44 °C, quando aclimatadas em temperaturas de 15 a 35 °C, respectivamente (Kubitza, 2000).

Os compostos nitrogenados (nitrito, nitrato e amônia) podem ser encontrados naturalmente nos ecossistemas aquáticos, através da decomposição e excreção de alguns organismos; porém é preciso atentar à intensificação desta entrada por atividades antrópicas, como atividades industriais e uso de fertilizantes na agricultura (Randall; Tsui, 2002). Neste sentido, o aumento de compostos nitrogenados na água é geralmente associado a mudança no uso do solo devido à conversão de áreas de mata nativa em áreas de agricultura e pecuária (Vitousek, 1997, p.494-499).

A amônia é considerada o principal produto de excreção dos peixes, e é encontrada no ambiente como nitrogênio amoniacal total (NAT) ($\text{NH}^3\text{-N}$), que atravessa a membrana celular, e portanto, é considerada potencialmente tóxica (Mehta, 2017).

O nitrito é encontrado naturalmente nos organismos e também é produzido pela oxidação de íons amônio, através do processo de nitrificação (Ha *et al.*, 2019). O nitrato entra em organismos aquáticos através da difusão passiva nas células branquiais, e a principal ação tóxica é devida à conversão endógena de nitrato em nitrito, causando a formação de metahemoglobina, que resulta na perda da capacidade de transporte de oxigênio no sangue (Gomez Isaza *et al.*, 2021, p.108920) E, conseqüentemente a morte dos indivíduos.

2.5. Hematologia

Os parâmetros hematológicos são utilizados no Brasil e no exterior como um fator de indicação ambiental e de saúde confiável de organismos (Seriani *et al.*, 2013). Nos peixes de clima temperados, estudos tiveram seu início no século passado e no Brasil, a partir da década de 1980, quando houve uma pesquisa mais intensa (Tavares-Dias; Moraes, 2004). A literatura confirma que os peixes que estão expostos a pesticidas, efluentes contaminados e metais apresentam alterações hematológicas, tanto em campo quanto em laboratório (Seriani *et al.*, 2013). Assim sendo, análises hematológicas de peixes expostos a esses contaminantes podem

ser importantes para avaliar e monitorar a qualidade ambiental (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

De acordo com Tavares-Dias e Moraes (2004), o sangue de peixes teleosteos é formado por eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Os eritrócitos são nucleados e elípticos; os leucócitos se dividem em linfócitos, monócitos, neutrófilos, heterófilos, eosinófilos e basófilos; e os trombócitos são células de defesa orgânica, com formato elíptico e alta relação núcleo:citoplasma (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013, 142p.) (Figura 1).

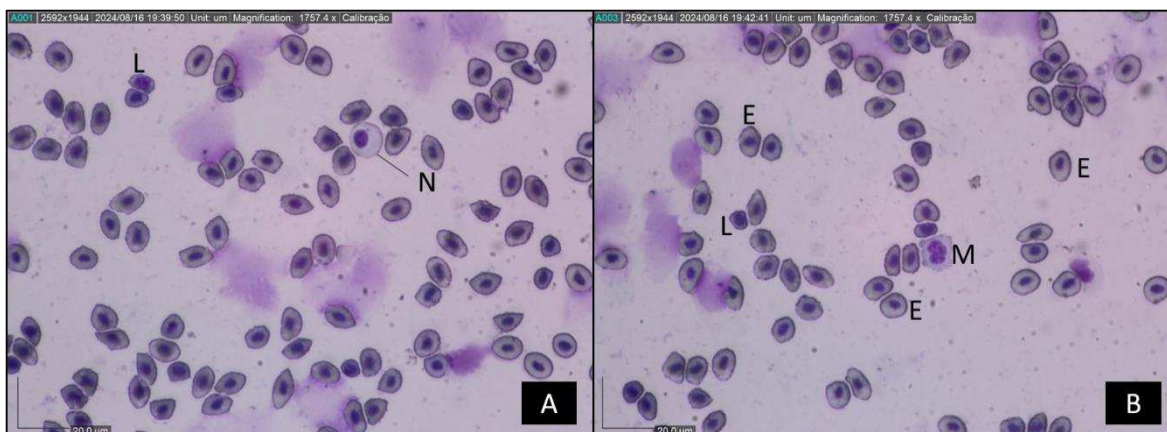


Figura 1 - Células sanguíneas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) juvenis. A: neutrófilo (N), linfócito (L); B: Eritrócitos (E), linfócito (L), monócito (M). Coloração: May Grünwald-Giemsa Wright (MGGW). Objetiva: 40x. Foto: Iara Pâmela Vasconcelos Martins Cristo, DVT/UFV, Viçosa (2024).

2.6. Histopatologia renal

Alterações histológicas resultam de uma diversidade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, e que podem levar à formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (Hinton e Laurén, 1990; Hinton *et al.*, 1992).

As alterações histológicas em tecidos de peixes são biomarcadores do efeito da exposição aos estressores do meio ambiente. Esta categoria de biomarcadores permite um exame específico dos órgãos e das células alvo, e como eles são afetados sob condições *in vivo*. Além disso, em avaliação de campo, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (Hinton *et al.*, 1992, p.155-196).

Lesões no tecido renal podem ser indicações de toxinas específicas e assim podem ser utilizados como indicadores para o monitoramento de efeitos de contaminantes (Overstreet, 1988; Hinton e Laurén, 1990; Schwaiger *et al.*, 1997). Entretanto, se comparado com as brânquias e com o fígado, as alterações histopatológicas renais em peixes vêm sendo utilizadas ainda de forma muito tímida como biomarcadores histológicos da contaminação aquática (Hinton *et al.*, 1992; Oliveira Ribeiro *et al.*, 1996; Schwaiger, *et al.*, 1997; Silva, 2001; Pacheco e Santos, 2002, p.331-347).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Além da grande importância do estudo visando agregar novos conhecimentos sobre uma espécie pouco questionada, também se torna relevante avaliar possíveis alterações histológicas e hematológicas em peixes quando esses são expostos a antibióticos, uma vez que ocorre descarte ambiental e uso indiscriminado em pisciculturas.

Dessa forma, este estudo permitiu a avaliação hematológica e histopatológica do rim diante da exposição crônica à amoxicilina, permitindo um estudo comparativo entre grupos expostos a diferentes concentrações do medicamento frente ao grupo não exposto.

3.1 Objetivo geral:

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da amoxicilina sobre a histologia renal e sobre a hematologia de tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas à amoxicilina de forma crônica e de animais não expostos.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a histologia da estrutura renal de cada animal;
- Avaliar qualitativamente patologias resultantes da exposição ao fármaco; e
- Avaliar a hematologia dos animais e comparar grupos expostos e controle caso haja alterações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CEUA

O presente estudo foi submetido para apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFV), tendo sido iniciado somente após sua aprovação (protocolo 42/2022). Durante o experimento todos os procedimentos foram seguidos de acordo com as normas da ABNT e da CEUA/UFV.

4.2. Ensaio experimental

No presente experimento foram empregadas 144 tilápias (*Oreochromis niloticus*). As tilápias foram separadas em três grupos expostos à amoxicilina e um grupo controle não exposto ao antibiótico.

Foram utilizados 12 aquários contendo doze peixes cada, totalizando 144 peixes, sendo três aquários para o grupo controle, com animais não expostos ao fármaco. Os outros nove aquários foram divididos em três grupos, onde os peixes foram expostos a três diferentes concentrações de amoxicilina (3, 6,5 e 10 μ g/L) durante 30 dias.

Foram formados grupos experimentais com tamanhos e pesos corporais homogêneos, uma vez que é necessário padronizar os animais para se ter um valor fidedigno das análises comparativas e estatísticas.

Previamente ao período experimental os peixes passaram por um período de aclimação de sete dias. A água utilizada foi proveniente do sistema exclusivo do Laboratório de Biologia de Peixes do DVT/UFV, e foi mantida sob oxigenação constante sete dias antes do período de aclimação dos animais para minimizar o efeito do cloro, e com termostato controlado em 26°C. Nesse período, foi mantido o pH dentro das condições desejáveis para o cultivo de peixes.

Durante o experimento, a água de cada aquário recebeu aeração constante com o uso de dois compressores de ar externos e também bombas submersas para a manutenção da concentração adequada de oxigênio. A temperatura foi controlada por meio de termostatos mantidos a 26°C, com ambos os parâmetros sendo monitorados uma vez ao dia. Diariamente foram realizadas mensurações de qualidade da água e, em seguida, o sifonamento para retirada de detritos e a reposição do antibiótico e da água em quantidade diária de 20L por aquário.

A quantidade de antibiótico em cada aquário foi determinada de acordo com concentrações pré-estabelecidas a partir do estudo de Aquino *et al.* (2021). No presente trabalho, foi utilizada a amoxicilina na apresentação comercial de 500mg, que foi diluída em 1 litro de água destilada. Os aquários 1, 2 e 3, receberam 3 μ g/L, totalizando 450 μ g de amoxicilina por aquário de 150 litros, correspondendo a 0,9 mL da solução previamente preparada, com reposição de 60 μ g para os 20 litros de troca diária de água do aquário, correspondendo a 0,12 mL da solução previamente preparada. Nos aquários 4, 5 e 6 foram adicionadas 6,5 μ g/L, totalizando 975 μ g de amoxicilina por aquário de 150 litros, correspondendo a 1,95 mL da solução

previamente preparada, com reposição de 130µg para 20 litros de troca diária de água do aquário, correspondendo a 0,26 mL da solução previamente preparada. Nos aquários 7, 8 e 9 foram adicionadas 10µg/L, totalizando 1.500µg de amoxicilina por aquário de 150 litros, correspondendo a 3 mL da solução previamente preparada, com reposição de 200µg para 20 litros de troca diária de água do aquário, correspondendo a 0,4 mL da solução previamente preparada.

A reposição foi calculada para trocas diárias de 20 litros de água de cada aquário, visando a limpeza dos mesmos, bem como manter as concentrações estabelecidas acima. A limpeza e a reposição do antibiótico nos aquários foram realizadas diariamente, sempre após a alimentação dos peixes. A solução de antibiótico também era preparada diariamente.

Atribuindo-se a possibilidade de uma taxa de mortalidade de 20% durante o experimento, e por não haver dimorfismo sexual dos peixes, foram coletados quatro peixes de cada aquário para que houvessem pelo menos 12 animais coletados por grupo e assim se atender às premissas estatísticas.

Os animais foram alimentados diariamente, *ad libitum*, com ração comercial balanceada para peixes, com teor proteico de 32%.

Após o período experimental, os 48 peixes foram utilizados para coleta de sangue para análises hematológicas. Na sequência os peixes foram anestesiados com Eugenol (1:10.000), seguindo-se eutanásia por aprofundamento da anestesia. Após esse procedimento, os 48 peixes tiveram o comprimento medidos e pesados individualmente para se obter dados biométricos de peso corporal e comprimentos total e padrão.

Após a eutanásia, a cavidade corporal foi exposta por incisão na linha mediana ventral para a coleta do rim, que foi fixado em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas. Após esse período, o fixador foi removido e os fragmentos de rim foram preservados em álcool a 70% até o início do processamento para estudo histológico.

4.3. Análise de água

Foram obtidos os parâmetros físico-químicos da água, verificando-se pH, temperatura e oxigênio dissolvido, mensurados diariamente no período da manhã, nitrito e amônia a cada 5 dias, e nitrato uma mensuração no início e uma ao fim do experimento pois é um composto bioacumulativo.

O potencial hidrogeniônico (pH), a temperatura (T°C), oxigênio dissolvido (OD, mg.L⁻¹) e oxigênio dissolvido percentual (%) foram monitorados utilizando a sonda multiparâmetro Sanxin modelo SX751. Amônia total (N-AT) (mg.L⁻¹, N-(NH₄+NH₃)) (Bendschneider; Robinson, 1952), nitrito (mg.L⁻¹, N-NO₂) (UNESCO, 1983) e nitrato (NO₃⁻) (Monteiro *et al.*, 2003) foram mensurados utilizando-se de espectrofotômetro Biochrom Libra S22.

4.4. Processamento histológico das amostras

Para análise histológica, as amostras colhidas e armazenadas em álcool a 70 % foram seccionadas em fragmentos menores para processamento histológico de acordo com métodos de rotina adotados no Laboratório de Biologia de Peixes do DVT/UFV, com os fragmentos sendo novamente lavados em álcool 70 %, por três vezes durante cinco minutos cada lavagem, seguidas de desidratação em álcool 90 % por 4 horas. Após a desidratação, os fragmentos foram submetidos à infiltração com historesina Leica® na proporção álcool:resina 1:1 por 24 horas, resina pura por 48 horas e, finalmente, emblocamento em resina glicolmetacrilato (Leica, Historesin®) utilizando-se moldes apropriados aos tamanhos das amostras. A seguir, as amostras foram colocadas em estufa (60° C/24 h) para polimerização da resina.

Os fragmentos de rim foram seccionados em micrótomo rotativo Leica® no sistema semisseriado com espessura de 4,0 µm e subsequente coloração com hematoxilina e eosina. A avaliação das amostras foi realizada em microscópio de luz (Nikon®, Eclipse E200).

Após esta etapa, foram obtidas imagens digitais utilizando-se do *software* Dino Capture 2.0 acoplado ao microscópio de luz (Nikon®, Eclipse E200). Após isso, as imagens obtidas digitalmente foram empregadas para avaliação histopatológica, a partir da qual foram classificadas de acordo com a tabela definida por Poleksić (1994).

4.5. Coloração de lâminas

Para coloração dos fragmentos de rins foram utilizados os corantes Hematoxilina e a Eosina. Segundo Paulete & Beçak (1976) esta técnica é composta dos reagentes hematoxilina, que possui características basófilas e cora o núcleo celular de azul, e eosina, que possui características acidófilas e cora o citoplasma da célula de rosa.

A coloração também seguiu a rotina do Laboratório de Biologia de Peixes do DVT/UFV.

4.6. Avaliação histológica e histopatológica

O programa utilizado foi o Dino Capture 2.0, um *software* de imagem que permite a captura de imagens e mensuração com calibração.

As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz em aumento de 40x, e fotomicrografadas, sendo classificadas quanto ao grau de lesões renais, de acordo com a tabela definida por Poleksić (1994) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação das alterações histológicas do rim quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem, modificado de Poleksić e Mitrović-Tutundžić (1994).

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS RENAIIS	ESTÁGIO
1. Alterações tubulares	
▪ Degeneração granular	I
▪ Hipertrofia celular	I
▪ Hipertrofia nuclear	I
▪ Vacuolização celular	I
▪ Dilatação da luz tubular	I
▪ Túbulos em regeneração	I
▪ Rompimento celular	II
▪ Degeneração hialina	II
▪ Oclusão da luz tubular	II
▪ Degeneração tubular	II
▪ Novos néfrons	II
2. Alterações glomerulares	
▪ Dilatação dos capilares	I
▪ Espessamento do endotélio capilar	I
▪ Aumento do volume glomerular	I
▪ Redução do espaço de Bowman	II
▪ Presença de hemácias no espaço de Bowman	II
▪ Extravasamento de sangue no espaço de Bowman (hemorragia)	II
3. Necrose	
▪ Necrose focal	III

4.7. Contagem de eritrócitos e leucócitos

Para realizar as análises hematológicas, foram coletadas amostras de sangue de 4 exemplares por aquário, totalizando 12 peixes por tratamento. A coleta de sangue foi via punção veno-caudal com seringas de 3 mL contendo heparina como anticoagulante. As amostras de sangue foram transferidas para microtubos que foram encaminhados para o processamento sob refrigeração.

Utilizou-se câmara de Neubauer, que contém dois retículos na porção central separados por um sulco, e uma lamínula retangular de vidro sobre esses retículos. A contagem dos leucócitos foi realizada nos quadrantes laterais e os eritrócitos no quadrante central (em apenas 5 quadrados) (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

Uma alíquota de 10 μL de sangue foi colocada em 2 mL (diluição 1:200) de solução formol-citrato com azul de toluidina para contagem de eritrócitos sanguíneos, em câmara de Neubauer ($\times 10^6/\mu\text{L}$), seguindo metodologia modificada por Oliveira-Junior *et al.* (2009). Os eritrócitos foram contados no quadrante central (em apenas 5 quadrados) (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

As lâminas foram fotomicrografadas no programa Dino Capture 2.0 para a contagem total de leucócitos. A contagem total de leucócitos foi realizada a cada 2000 eritrócitos computados.

4.8. Hematócrito e hemoglobina

Uma alíquota do sangue foi utilizada para determinação do hematócrito pelo método do microhematócrito (Goldenfarb *et al.*, 1971). Foi utilizado capilar heparinizado com comprimento de 75mm e diâmetro interno de 1,0mm. Os capilares contendo sangue foram centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm e as leituras foram realizadas imediatamente após a centrifugação (Gráfico 2).

A concentração de hemoglobina (Hb) foi avaliada pelo método da cianometahemoglobina, onde os compostos de hemoglobina, com exceção da sulfahemoglobina, são rapidamente convertidos a cianometahemoglobina, sob ação do ferrocianeto de potássio e do cianeto de potássio (Collier, 1944).

Foram adicionados 10 μL de amostra do sangue em 2,5 mL de solução de Drabkin (kit comercial Bioclin ®). Após 30 minutos foram feitas as leituras no espectrofotômetro (Biochrom Libra S22) a 540 nm (nanômetros) tendo como padrão uma solução comercial contendo 11,3 mg/dL de hemoglobina (Bioclin®).

Após a leitura da absorbância, o valor foi multiplicado pelo fator de correção calculado na curva padrão (Ranzani-Paiva *et al.* 2013).

4.9. Índices hematimétricos

Para determinação dos índices hematimétricos (Volume Corpuscular Médio - VCM, Hemoglobina Corpuscular Média - HCM e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média - CHCM) foram utilizados cálculos a partir do hematócrito, da hemoglobina e da contagem de eritrócitos (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

- Volume Corpuscular Médio (VCM): avalia o volume dos eritrócitos.

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Número de eritrócitos} (\times 10^6 \mu\text{L}^{-2})} = \text{fL}$$

- Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): determina a quantidade de hemoglobina existente em cada eritrócito.

$$\text{HCM} = \frac{\text{Taxa de hemoglobina} \times 10}{\text{Número de eritrócitos}} = \text{pg}$$

- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM): relacionada à concentração do pigmento hemático nos eritrócitos.

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Taxa de hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}} = \text{g dL}^{-1}$$

4.10. Análises dos dados

Os dados estão representados como média, desvio padrão e foram estudados através de testes de comparação de média por meio do Anova (One-way), seguido de análise de de variância, para testar variações nos valores médios nas coletas entre os grupos expostos e controle.

Foi realizado o teste Tukey ($p < 0,05$) para comparar as médias entre exposições quando foram registradas diferenças significativas. Quando os valores não se enquadraram dentro da normalidade, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$ foi utilizado como critério de significância) no programa IBM SPSS Statistics versão 25.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise de água

5.1.1. Parâmetros físicos

Os parâmetros foram avaliados diariamente durante 21 dias para garantir a qualidade da água utilizada, uma vez que alterações podem ocasionar toxicidade e mortalidade dos peixes. As condições adequadas para manter a qualidade da água foi seguida de acordo com os padrões estabelecidos na Resolução CONAMA (2005).

De acordo com os parâmetros de qualidade da água avaliados, foi evidenciado que a temperatura média dos aquários de concentração 3 μ g se manteve em 26,9°C, dos aquários de concentração 6,5 μ g se manteve em 26,9°C, dos aquários de concentração 10 μ g se manteve em 26,6°C e dos aquários do grupo controle a temperatura se manteve em 27,2°C (Figura 2).

O oxigênio dissolvido se manteve em 5,6mg.L⁻¹ nos aquários de concentração 3 μ g, nos aquários de concentração 6,5 μ g o OD se manteve em 5,8mg.L⁻¹, na concentração de 10mg.L⁻¹ se manteve em 5,5mg.L⁻¹ e no grupo controle se manteve em 5,7 mg.L⁻¹ (Figura 3).

O pH esteve em 6,3 nos aquários de concentração 3, nos aquários de concentração 6,5 esteve em 6,1, nos aquários de concentração 10 esteve em 6,2 e no grupo controle esteve em 6,1 (Figura 4).

Figura 2 – Temperaturas diárias durante 21 dias do experimento.

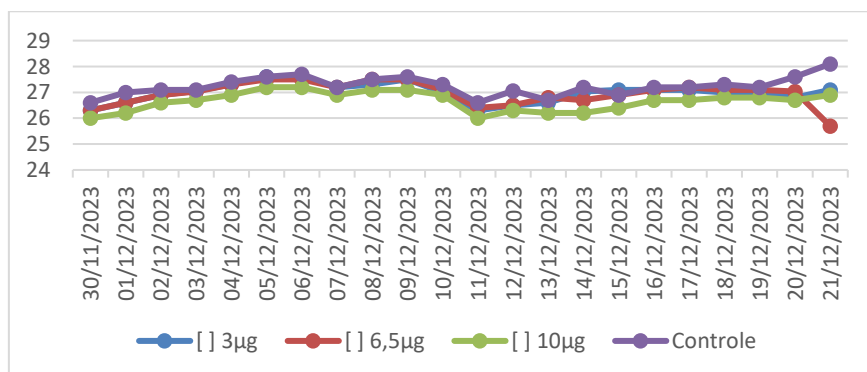


Figura 3 – Oxigênio dissolvido durante 21 dias do experimento.

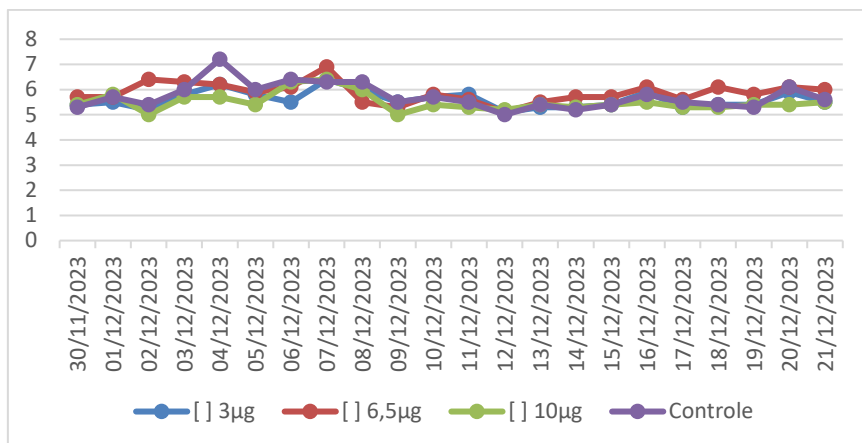
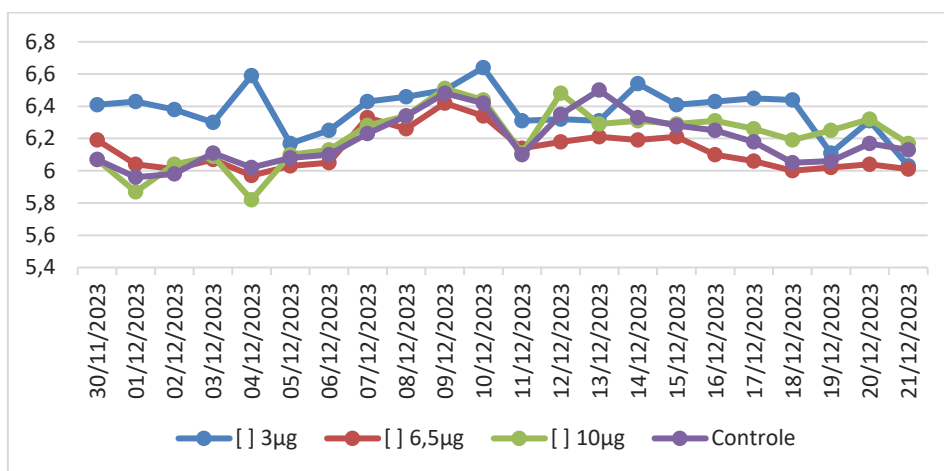


Figura 4 – Aferição de pH durante 21 dias do experimento.



Os parâmetros de qualidade da água se mantiveram dentro dos padrões recomendados para o manejo de tilápias (Tabela 2). Foram observadas diferenças ($p < 0,05$) para as variáveis temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e pH, sendo realizado o teste de Tukey (Apêndice B).

Tabela 2 – Médias dos parâmetros da qualidade de água nas exposições à amoxicilina e grupo controle.

Variáveis	3µg	6,5µg	10µg	CT	DP	P
T	26,99 ^b	26,95 ^b	26,65 ^c	27,23 ^a	0,4648	0,000
OD	5,60 ^c	5,86 ^a	5,50 ^c	5,72 ^b	0,4476	0,023
Ph	6,37 ^a	6,13 ^c	6,21 ^b	6,19 ^b	0,1754	0,000

Médias de acordo com o teste ANOVA. Concentrações utilizadas descritas em µg, grupo controle (CT), coeficiente de variação (CV) e teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Letras diferentes na linha indicam diferenças estatísticas entre os grupos.

5.1.2. Compostos nitrogenados na água

As concentrações médias encontradas dos compostos nitrogenados são observadas na Tabela 3. Nitrito e nitrato resultaram em diferenças significativas quando comparados na média ($p < 0,05$) e Amônia tóxica resultou em diferenças significativas quando comparada entre grupos ($p < 0,05$), sendo realizado o teste de Tukey (Apêndice B).

Tabela 3 – Médias e coeficiente de variação dos compostos nitrogenados da água por concentração de exposição e grupo controle.

Variáveis	3 μ g	6,5 μ g	10 μ g	CT	CV	P
Amônia tóxica (mg.L ⁻¹)	26,99	26,95	26,65	27,23	33,11	0,053
Nitrito (mg.L ⁻¹)	5,60	5,86	5,50	5,72	56,94	0,491
Nitrato (mg.L ⁻¹)	6,37	6,13	6,21	6,19	36,32	0,500

Médias de acordo com o teste ANOVA. Concentrações utilizadas descritas em μ g, grupo controle (CT), coeficiente de variação (CV) e teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Conforme esperado, as diferenças nas concentrações de nitrito e nitrato por aquário sofrem alteração devido a concentrações diferentes do antibiótico diluído na água juntamente com a excreção urinária dos peixes, mesmo com a realização de limpeza e reposição de água e antibiótico (Figura 5, 6 e 7).

Figura 5 – Concentração média de nitrito por aquário.

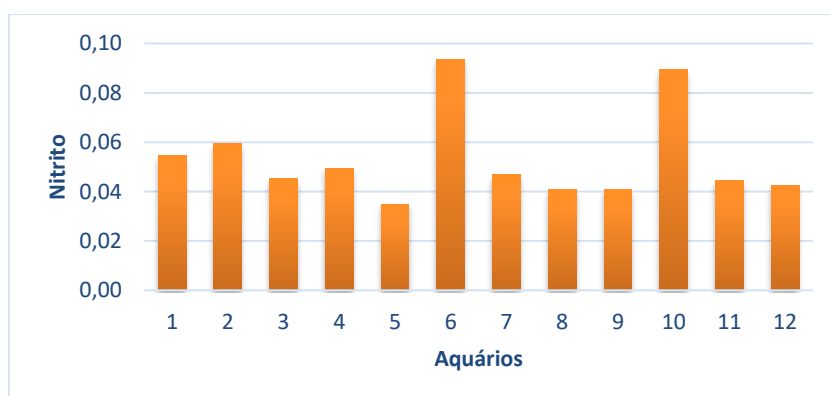


Figura 6 – Concentração média de nitrato por aquário.

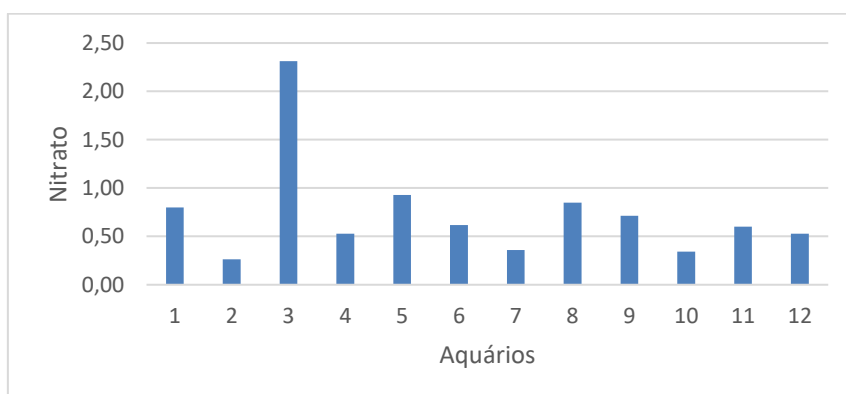
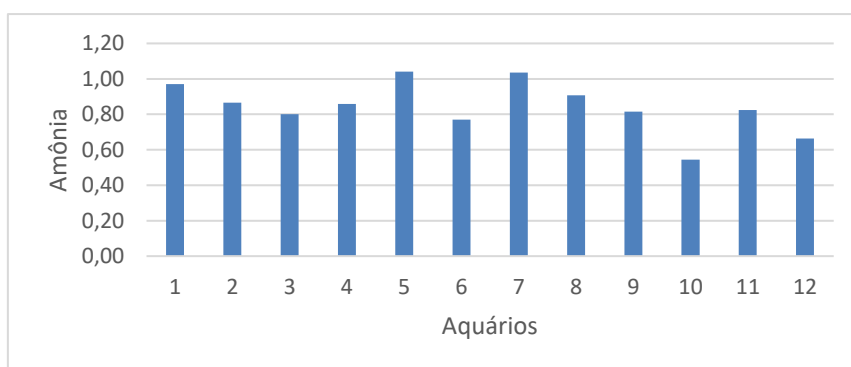


Figura 7 – Concentração média de amônia por aquário.



O nitrito é tóxico para os peixes mesmo em baixas concentrações (Kubitza, 2019, p.20-21). Os efeitos da exposição ao nitrito incluem danos histopatológicos em órgãos-alvos específicos, como patologias associadas ao rim, como lesão do corpúsculo renal, degeneração severa das células dos túbulos renais, hemorragia e difusão dos eritrócitos no líquido intersticial (Grynevych *et al.*, 2018, p.41–50). O aumento da temperatura pode influenciar na fisiologia dos peixes, com efeitos sinérgicos ou antagonistas. Peixes australianos da espécie *Perca prateada*, *Bidyanus bidyanus*, foram expostos à bioacumulação de nitrito em diferentes concentrações e temperatura: 28°C (temperatura do local de estudo) e 32 °C (temperatura elevada) por 21 semanas (Gomez Isaza *et al.*, 2021, p.108920). Os autores relatam que a o composto acumulado em grande escala reduziu a capacidade de transporte de oxigênio no sangue, devido ao aumento da metahemoglobina, em ambas as temperaturas. Já a exposição à temperatura mais alta (32°C) foi capaz de aumentar a área da superfície branquial e a espessura ventricular, independente da concentração do nitrito. Como conclusão, os autores indicam que essa plasticidade do sistema cardiorrespiratório fornece proteção à exposição simultânea ao nitrito e altas temperaturas.

Estudos que avaliaram a toxicidade da amônia, demonstraram que ela induz o estresse oxidativo, alterando a atividade de enzimas antioxidantes (Kim *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019), e também induz a imunossupressão, inflamação e apoptose (Li *et al.*, 2020).

A temperatura dos grupos se manteve dentro da referência para tilápias, sofrendo mínima variação entre os dias devido a condições ambientais, mas bem

controladas por termostato. O aumento da temperatura impacta na fisiologia dos peixes (Alfonso *et al.*, 2020) e pode influenciar na toxicidade dos compostos nitrogenados (Mehta, 2017).

5.2. Análise hematológica

Os eritrócitos apresentaram contagem média total mais baixa no grupo controle (Figura 8) e mais alta no grupo de concentração maior de exposição à amoxicilina (10 μ g) (Figura 9). A concentração média de hematócrito se manteve padronizada, ficando maior também no grupo de maior exposição ao fármaco (10 μ g) (Figura 10). Segundo Tavares-Dias e Faustino (1998), o hematócrito é o índice de menor variação média entre as diferentes espécies de tilápias, estando em concordância com a literatura, sugerindo que é um bom indicador dos efeitos dos diversos fatores ambientais que os peixes estão sujeitos.

Figura 8 – Média da contagem total de eritrócitos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) juvenis por concentração e grupo controle.

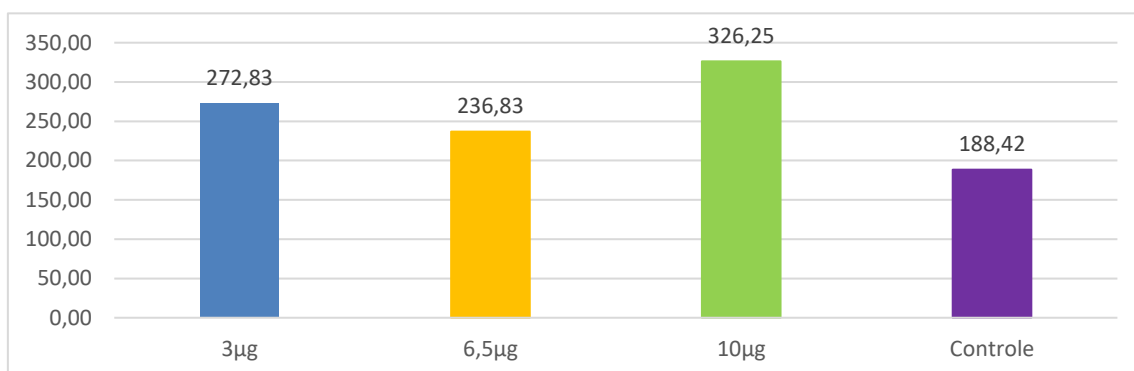


Figura 9 – Concentração média de eritrócitos por grupo.

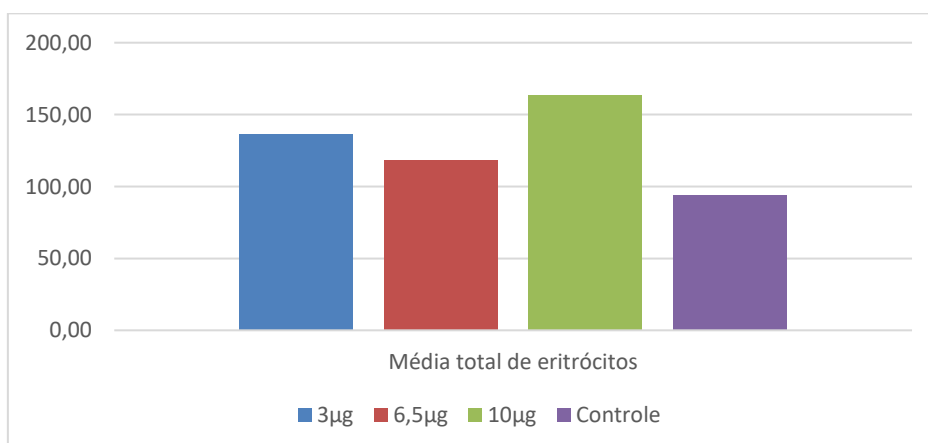
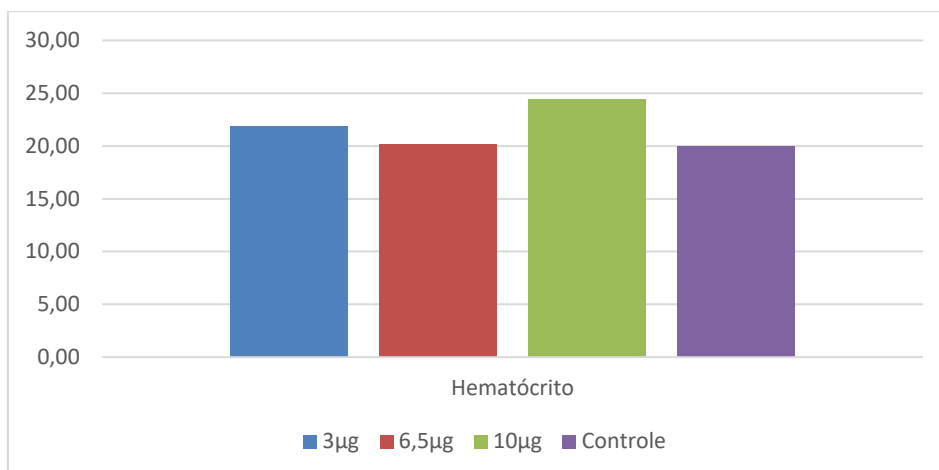
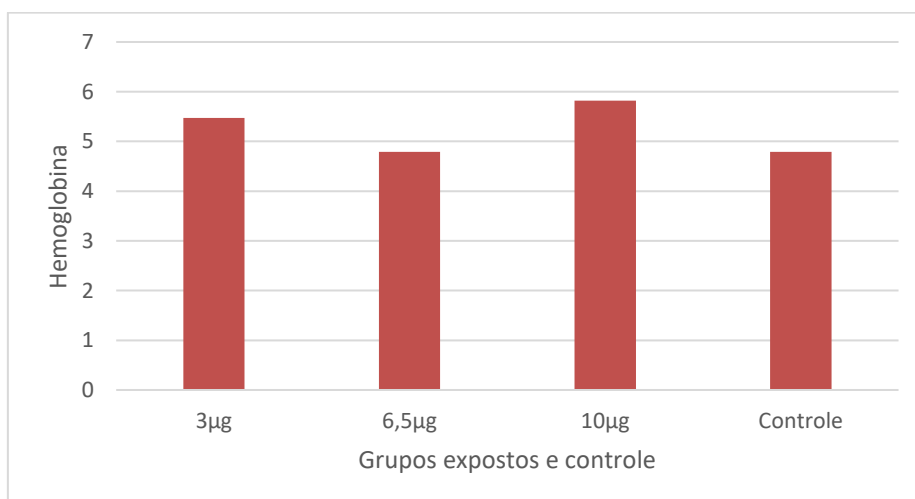


Figura 10 – Concentração média de hematócrito por grupo.



A hemoglobina teve maior concentração nos grupos expostos de concentração 3 e 10µg de amoxicilina, e menor concentração no grupo exposto a 6,5µg do fármaco e no grupo controle (Figura 11). De acordo com Tavares-Dias e Moraes (2004), a concentração de hemoglobina pode se elevar durante um estímulo de estresse, como consequência do aumento na demanda de consumo de oxigênio, assim sendo, o aumento da Hb sugere maior capacidade de transporte de oxigênio devido ao aumento na demanda energética.

Figura 11 – Concentração média de hemoglobina por grupo.



A análise das variáveis Hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), Eritrócitos, VCM, HCM e CHCM não mostrou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as exposições e grupo controle. Porém, as variáveis hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), eritrócitos mostraram alterações que condizem estar abaixo dos valores de

referência para tilápias. As variáveis VCM e HCM se mostraram acima dos valores de referência, e a variável CHCM não sofreu alteração, estando dentro do valor de referência (Tabela 4).

Vosyliené (1999) afirma que o estresse leva à ação de glicocorticoides no organismo dos peixes, havendo alterações dos níveis de cortisol no sangue, o que acarreta modificações fisiometabólicas que são observadas no aumento dos eritrócitos e na redução do VCM.

Houve tal alteração nessa pesquisa, visto que pode ser consequência do manejo diário de aferição dos parâmetros, alimentação, limpeza dos aquários e reposição do fármaco.

Um dos efeitos causados pela liberação de catecolaminas é o aumento da capacidade de oxigenação no sangue, fazendo que, entre outros mecanismos, haja um aumento do volume dos eritrócitos, aumentando os níveis do hematócrito (Wendelaar Bonga, 2011), surtindo efeito inverso no CHCM, e não ocorreu esse evento neste estudo.

Tabela 4 – Eritrograma de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a diferentes concentrações de amoxicilina e grupo controle.

Variáveis	3µg	6,5µg	10µg	CT	CV	P
Ht (%)	21,83	20,17	24,42	20,0	20,64	0,071
Hb (g.dL ⁻¹)	5,47	4,79	5,82	4,79	22,47	2,490
VCM (fL)	173,26	191,48	167,93	207,95	46,32	0,685
HCM (pg)	41,61	44,97	39,80	51,40	48,33	0,607
CHCM (g.dL ⁻¹)	25,05	23,74	23,83	23,95	16,21	0,480
RBC (Eri x106 µL)	1,36	1,18	1,63	0,94	50,10	0,078

* Valores médios em diferentes concentrações de amoxicilina e grupo controle, de acordo com o teste ANOVA e Tukey. Ht (Hematócrito), Hb (Hemoglobina), VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média), Eri (Eritrócitos).

O leucograma permite uma avaliação das condições imunológicas dos peixes, bem como identificar possíveis infecções bacterianas, se tornando importante neste estudo visto que o agente escolhido para exposição é um antibiótico.

Tabela 5 – Leucograma de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a diferentes concentrações de amoxicilina e grupo controle.

Variáveis	3µg	6,5µg	10µg	CT	CV	P
Linfócitos ($\mu\text{L}^{-1} \times 10^6$)	60,67 _b	106,83 _a	46,33 _c	64,67 _b	12,66	0,000
Monócitos ($\mu\text{L}^{-1} \times 10^6$)	6,42 _a	2,33 _b	1,08 _c	1,50 _c	52,70	0,000
Neutrófilos ($\mu\text{L}^{-1} \times 10^6$)	67,17 _b	66,33 _c	110,92 _a	66,83 _c	10,31	0,000
Eosinófilos ($\mu\text{L}^{-1} \times 10^6$)	0,00	0,00	0,00	0,08	86,60	0,402

* Valores médios em diferentes concentrações de amoxicilina e grupo controle, de acordo com o teste ANOVA e Tukey. Letras diferentes na linha indicam diferenças estatísticas entre os grupos.

Houve alteração na contagem dos leucócitos citados na tabela 5 na análise estatística, apresentando variação entre os grupos expostos e grupo controle (Apêndice B).

Os linfócitos e neutrófilos são células de maior variação média entre as tilápias. Porém, os percentuais médios de monócitos são pouco discrepantes. Ezzat *et al.* (1974) correlacionaram o aumento no percentual de neutrófilos e eosinófilos com o aumento do crescimento do peixe, e com o período de desova, o que não ocorreu neste experimento. Situações de estresse desencadeiam alterações nos parâmetros hematológicos, como a redução de leucócitos (leucopenia), causando linfocitopenia e neutrofilia (Tavares-Dias; Moraes, 2004), o que não ocorreu no presente estudo.

5.3. Análise histopatológica

As alterações histopatológicas foram avaliadas de acordo com o Valor Médio de Alteração (VMA), baseando na incidência de lesões, descrito por Schwaiger *et al.* (1997). Para tanto, foi atribuído um valor numérico para cada animal, conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histopatológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão).

Foram observadas alterações renais de estágio I, II e III, de acordo com o grau de severidade e comprometimento da função renal, conforme mostra a Tabela 5. No grupo de exposição a 3µg de amoxicilina foram observadas lesões como

vacuolização celular e uma necrose focal. Na exposição de 6,5µg do fármaco observou-se hipertrofia celular e dilatação dos capilares. No grupo de exposição à amoxicilina de concentração 10µg foi observado degeneração tubular e presença de hemácias no espaço de Bowman. E no grupo controle foi observado maior quantidade de lesões, como degeneração tubular, oclusão da luz tubular, presença de hemácias no espaço de Bowman e redução do espaço de Bowman.

O VMA demonstrou que os tratamentos apresentaram maior ocorrência de lesões pontualmente localizadas, apesar de terem ocorrido alguns casos de lesões amplamente distribuídas pelo rim no grupo controle.

Tabela 6 – Classificação de alterações histológicas de cada concentração de acordo com o grau.

Amostra	3µg	6,5µg	10µg	CT
1	I	I	I	II
2	I	I	II	II
3	III	I	I	II
4	I	I	I	I
5	I	I	I	II
6	I	I	II	II

O rim recebe grande fluxo sanguíneo e a presença de compostos químicos no sangue pode desencadear algumas mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, levando a redução do mesmo. Além disso, pode ocorrer o aparecimento de células sanguíneas ou agregados, ou também de matéria estranha no espaço de Bowman (Hinton *et al.*, 1992, p.155-196; Takashima e Hibiya, 1995). O excesso de hemácias nos capilares pode levar ao rompimento desses vasos e, nesse caso, é comum encontrar hemácias no espaço de Bowman (Takashima e Hibiya, 1995). Segundo Hinton & Laurén (1990) a regeneração tubular em peixes pode ser uma boa indicação de adaptação e recuperação. Neste trabalho, não foi observado regeneração tubular.

5.4. Panorama sobre antibiótico residual na água

Habitats de água doce estão entre os habitats naturais que abrigam a mais rica diversidade bacteriana (Sieber *et al.*, 2020, p.1–11), sendo um dos habitats bacterianos mais importantes na Terra, e uma considerável maneira de disseminação de microrganismos na natureza, tendo sido reconhecido como um reservatório significativo de resistência a antibióticos.

A água não constitui apenas um meio de disseminação de organismos resistentes aos antibióticos entre populações humana e animais, mas, também, a via pela qual os genes de resistência são introduzidos em ecossistemas bacterianos naturais. As bactérias patogênicas e

potencialmente patogênicas são constantemente liberadas, através de águas residuais, para o meio aquático. Muitos desses organismos abrigam genes de resistência a antibióticos, eventualmente inseridos por elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) capazes de se propagar entre as comunidades bacterianas de água e solo (Sultan *et al.*, 2018, p.1–16).

É inegável a importância de elementos ambientais, como água ou solo, sobre o ciclo de resistência aos antibióticos na natureza, seja porque os mecanismos de resistência aos antibióticos podem se originar em bactérias ambientais ou porque bactérias comensais e patogênicas a humanos e animais podem contaminar o meio ambiente (Kraemer *et al.*, 2019, p.1-24).

Além do mau uso clínico, o uso inadequado de antibióticos no ambiente agrícola é um dos principais contribuintes para o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos. Alguns dos mesmos antibióticos que são usados para tratar patógenos humanos, tais como amoxicilina e eritromicina, também são usados para tratar doenças, promover o crescimento e melhorar a eficiência alimentar em animais (Baptista *et al.*, 2018; Economou; Gousia, 2015; Sousa *et al.*, 2019, p.584–593).

6. CONCLUSÕES

As concentrações de amoxicilina podem alterar variáveis hematológicas e histopatológicas das tilápias do Nilo. Os parâmetros físicos da água se mantiveram dentro das referências e do esperado. Visto também que há um grande descarte residual desse fármaco, podemos concluir que a resistência bacteriana aumenta cada vez mais e que pode trazer alterações fisiológicas aos organismos aquáticos, alterando diretamente a cadeia alimentar, trazendo prejuízos ambientais e também pode oferecer risco à saúde humana.

REFERÊNCIAS

AKIBA, M.; SEKIZUKA, T.; YAMASHITA, A.; KURODA, M.; FUJII, Y.; MURATA, M.; LEE, K.; JOSHUA, DI.; BALAKRISHNA, K.; BAIRY, I.; SUBRAMANIAN, K.; KRISHNAN, P.; MUNUSWAMY, N.; SINHA, R.K.; IWATA, T.; KUSUMOTO, M.; GURUGE, K.S. Distribuição e relações de determinantes de resistência antimicrobiana entre cefalosporinas de espectro estendido-re- Isolados de *Escherichia coli* resistentes ou resistentes a carbapenêmicos de rios e estações de tratamento de esgoto na Índia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.60, p.2972-2980, 2016.

ALFONSO, S.; GESTO, M.; SSDOUL, B. Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. **Journal of Fish Biology**. v.39, 2020.

AQUINO, S.F.; BRANDT, E.M.F.; BOTTREL, S.E.C.; GOMES, F.B.R.; SILVA, S.D.Q. Occurrence of Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in Brazilian Water and the Risks They May Represent to Human Health. **International Journal Environment Research Public Health**. v.18, 11765p., 2021.

BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Editora Manole LTDA, p.655, 1992.

BAPTISTA, D.Q.; SANTOS, A.F.M.; AQUINO, M.H.C.; ABREU, D.L.C.; RODRIGUES, D.P.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. serotypes in broiler chickens and carcasses in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.38, n.7, p.1278–1285, 2018.

BARROS, L.A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R.L. Larvas de nematoides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus*, bloch, 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.533-535, 2007.

BENDSCHNEIDER, K.; ROBINSON, R.J. New spectrophotometric method for the determination of nitrite in water. **Fresenius Environmental Bulletin**. v.1, 1-18, 1952.

BERNARDINO, M.G.S. *et al.* Avaliação ectoparasitológica, hematológica e histopatológica de traíras *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 provenientes de açudes localizados no município de Sumé, estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 36, p.581-586, 2016.

BIZZOTT, P.M.; GODINHO, H.P. Morphometric evaluation of the spermatogenesis in trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Characiformes, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v.24, p.541-544, 2007.

BOYD, C.E. **Water quality: an introduction**. Norwell: Kluwer Academic Publishers. p.330, 2000.

BUIKEMA, A.L.; VOSHELL, J.R. Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. p.344-398, 1993.

CALVO, J; MARTÍNEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**. v. 27, p.44-52, 2009.

CANNON, M.S. *et al.* Na ultrastructural study of the leucocytes of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal Morphology**. v.164, p.1-24, 1980.

CASTRO, J.S.; SILVA, J.S.; FREITAS, L.C.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, *Osteichthyes*, *Erythrinidae*) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, p.6, 2014.

CHAUDHURY, A.; NATH, G.; SHUKLA, B. N.; SANYAL, S. C. Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. **Journal of Medical Microbiology**. v. 44, p.434-437, 1996.

DE JESUS GAFFNEY, V.; ALMEIDA, C.M.M.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M.J.; CARDOSO, V.V. Occurrence, Fate, Removal and Assessment of Emerging Contaminants in Water in the Water Cycle (from wastewater to drinking water). **Water Research**. v.72, p.199–208, 2015.

DRUMOND, G.V.F.; CAIXEIRO, A.P.A.; TAVARES–DIAS, M.; MARCON, J.L.; AFFONSO, E.G. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. **Acta Amazônica**. v.40, p.591-596, 2010.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v.8, p.49-61, 2015.

EL SAYED, A.F.M. Tilapia culture. **CABI Publishing**, London. 2006.

EZZAT, A.A.; SHABANA, M.B.; FARGHALY, A.M. Studies on blood characteristics of *Tilapia zilli* (Gervais). I. Blood cells. **Journal Fish Biology**. v.6, p.1-12, 1974.

FAO. Situação Mundial da Pesca e da Aquicultura 2018 - Cumprimento dos objetivos de desenvolvimento sustentável, Roma. 2018.

CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E. de A.; RIBEIRO, L.P.; COSTA, Â.A.P.; MELO, D.C. de; CINTRA, A.P.R.; PRADO, S. de A.; COSTA, F.A.A.; DRUMOND, M.L.; LOPES, V.E.; MORAES, V.E. de. O surubim na aquicultura do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, p.150-158, 2006.

CHEN, Y.; ZHOU, J.L.; CHENG, L.; ZHENG, Y.Y.; XU, J. Sediment and salinity effects on the bioaccumulation of sulfamethoxazole in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**. v.180, p.467-475, 2017.

FEIN, I.A.; MULLANY, L.; WALDERS, W. Measured and estimated glomerular filtration rate. New Engl. **Nature Reviews Nephrology**. v.355, p.1067-1070, 2006.

FENT, K.; ESCHER, C.; CAMINADA, D. Atividade estrogênica de produtos farmacêuticos e misturas farmacêuticas em um sistema de gene repórter de levedura. **Reproductive Toxicology**. v.22, p.175-185, 2006.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic mammals. *In*: Martinez-Garcia, F., REGARDERA, J. eds. Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview. **España: Churchill Communications**, p.197-219, 1998.

GOMEZ ISAZA, D.F.; CRAMP, R.L.; FRANKLIN, C.E. Thermal plasticity of the cardiorespiratory system provides cross-tolerance protection to fish exposed to elevated nitrate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**. v.240, p.108920, 2021.

GONÇALVES, P.C.; MORELLI S. Estudo cariotípico da população de *Hoplias malabaricus* do Rio das Pedras, 2000.

GRYNEVYCH, N.; SLIUSARENKO, A.; DYMAN, T.; SLIUSARENKO, S.; GUTYJ, B.; KUKHTYN, M. Impact of provincial water management on environment and social welfare in West of Zayanderood Basin, Iran. **Ukrainian Journal of Ecology**. v.8, p.41–50, 2018.

GUZMÁN-GUILLÉN, R.; PRIETO, O.A.I.; MORENO, I.M.; RÍOS, V.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; VASCONCELOS, V.; CAMEÁN, A.M. Effects of depuration on histopathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**. v.32, p.1318-1332, 2017.

HA, N.T.K.; HUONG, D.T.T.; PHUONG, N.T.; BAYLEY, M.; JENSEN, F.B. Impact and tissue metabolism of nitrite at two acclimation temperatures in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). **Aquatic Toxicology**. v.212, p.154-161, 2019.

HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**. v.8, p. 51- 66, 1990.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT R.J.; KIMERLI, R.A.; MEHRLE Jr, P.M.; BERGMAN, H.L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. **Boca Raton: Lewis Publishers**. cap.4, p.155-196, 1992.

HIRSCH, D.; PEREIRA, D.J.J.; LOGATO, P.V.R.; PICCOLI, R.H.; FIGUEIREDO, H.C.P. Identification and antimicrobial resistance of motile *Aeromonas* isolated from fish and aquatic environment. **Ciência e Agrotecnologia**. v.30, p.1211-1217, 2006.

HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L., SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**. v.29, p.7-12, 2000.

IANNACONE, J.; ALVARINO, L. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. **Ecología Aplicada**. v.8, p.71-80, 2009.

IRIA, A. R. B. Efeitos da presença de antibióticos nas origens de água: contribuição para o estudo da sua remoção através de sistemas de tratamento de águas **Dissertação de Mestrado**. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2018.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p.488, 2004.

KIM, J. H.; PARK, H. J.; HWANG, I. K.; HAN, J. M.; KIM, D. H.; OH, C. W.; LEE, J. S.; KANG, J. C. Toxic effects of juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria* by ammonia exposure at different water temperature. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.54, p.169-176, 2017.

KIRON, V. Sistema imunológico dos peixes e sua modulação nutricional para cuidados de saúde preventivos. **Animal Feed Science and Technology**. v.173, p.111–133, 2012.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. **Environ Science Technology**. v.36, p.1202-1211, 2002.

KRAEMER, S.A.; RAMACHANDRAN, A.; PERRON, G.G. Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. **Microorganisms**. v.7, p.1-24, 2019.

KRAWIEC, D.R.; TWARDOCK, A.R.; BADERTSCHER, R.R. *et al.* Use of ^{99m}Tc-Dietylenetriaminepentaacetic acid for assessment of renal function in dogs with suspected renal disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**., v.192, p.1077-1080, 1988.

KUBITZA, F. Alimentação automatizada na aquicultura: ganhos em eficiência e redução de custos. **Panorama da aquicultura**. v.29, p.20-21, 2019.

KUBTIZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. São Paulo: **Degaspari**, 285 p., 2000.

KUMAR, A.; CHANG, B.; XAGORARAKI, I. Avaliação de risco para a saúde humana de produtos farmacêuticos na água: questões e desafios futuros. *Internacional J. Meio Ambiente*. **Registro Eletrônico de Saúde - Saúde Pública**. v.7, p.3929–3953, 2010.

LEUNG, H. W.; JIN, L.; WEI, S.; TSUI, M. M. P.; ZHOU, B.; JIAO, L. *et al.* Pharmaceuticals in tap water: human health risk assessment and proposed monitoring framework in China. **Environmental Health Perspectives**. v.121, n.7, p. 839–846, 2013.

LI, M.; ZHANG, M.; QIAN, Y.; SHI, G.; WANG, R. Ammonia toxicity in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): The mechanistic insight from physiological detoxification to poisoning. **Fish and Shellfish Immunology**. v.102, p.195–202, 2020.

LIMA, de B. N.; ARANDAS, M.J.G.; SILVA, F.R.; SILVA, D.V.; TEIXEIRA, A.A.C.; AGUIAR, F.C.A.J.; GARCIA, J.E.; SANTOS, K.R.P. Estágio reprodutivo, histologia e morfometria sazonal do testículo de *Dermanura cinerea* (Chiroptera: Phyllostomidae) em fragmento de Mata Atlântica no Litoral Sul de Pernambuco, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**. v.108, 2018.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica Agrária Ambiental**. v.8, p.469-484, 2010.

LIU, M.; ZHANG, Y.; YANG, M.; TIAN, Z.; REN, L.; ZHANG, S. Abundance and distribution of tetracycline resistance genes and mobile elements in an oxytetracycline production wastewater treatment system. **Environ Science Technology**. v.46, p.7551–7557, 2012.

LIU, J.; LU, G.; XIE, Z.; ZHANG, Z.; LI, S.; YAN, Z. Occurrence, bioaccumulation and risk assessment of lipophilic pharmaceutically active compounds in the downstream rivers of sewage treatment plants. **Science of the Total Environment**. v.511, p.54-62, 2015.

LIU, X.; STEELE, J.C.; MENG, X.Z. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: a review. **Environmental Pollution**. v.223, p.161–169, 2017c.

LUO, Y.; XU, L.; RYSZ, M.; WANG, Y.; ZHANG, H.; ALVAREZ, P.J. Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China. **Environ Science Technology**. v.45, p.1827–1833, 2011.

MATTA, S. L. P.; D. A. R. VILELA; H. P. GODINHO & L. R. FRANÇA. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**. v.143, p.970-978, 2002.

MAURYA, H.; KUMAR, T.; KUMAR, S. Anatomical and Physiological Similarities of Kidney in Different Experimental Animals Used for Basic Studies. **Journal of Clinical & Experimental Nephrology**. v.3, 2018.

METHA, K. Impact of Temperature on Contaminants Toxicity in Fish Fauna: A Review. **Indian Journal of Science and Technology**. v.10, p.1-6, 2017.

MIRANDA, C.D.; GODOY, F.A.; LEE, M.R. Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. **Frontiers in Microbiology**. v.9, p.1284, 2018.

MONTEIRO, M.I.C.; FERREIRA, F.N.; OLIVEIRA, N.M.M.; ÁVILA, A.K. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. **Analytica Chimica Acta**. v.477, 125-129, 2003.

MORAIS, D.B.; CUPERTINO, M.C.; GOULART, L.S.; FREITAS, K.M.; FREITAS, M.B.D.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P. Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. **Animal Reproduction Science**. v.140, p.268-278, 2013.

MORO, G.V.; RODRIGUES, A.P.O.; TORATI, L.S.; BARROSO, R.M.; LUNDSTEDT, L.M. Anatomia e fisiologia de peixes de água doce. **Embrapa Pesca e Aquicultura**. c.2, p.71-95, 2013.

NEGRÃO, J.N.C. Avaliação da atividade gonadal de machos e fêmeas de pescada branca (*Plagioscion squamosissimus*, HECKEL, 1840) (Pisces, Teleostei, Sciaenidae), no Rio Pará (PA). **Tese (Doutorado em Zoologia)**. Convênio Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará, Pará. p.65-134, 2006.

OLIVEIRA, D.C.; BENNEMANN, S.T. Ictiofauna, recursos alimentares e relações com as interferências antrópicas em um riacho urbano no sul do Brasil. **Biota Neotropical**, v.5, p.1-13, 2005.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FANTA, E.; TURCATTI, N.M.; CARDOSO, R.J.; CARVALHO, C.S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). **Biocell**. v..20, p.171-178, 1996.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M. *et al.* Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**. v.101, p.74-80, 2006.

OVERSTREET, R.M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. **Aquatic Toxicology**. v.11, p.213-239, 1988.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.53, p.331-347, 2002.

PARENTI, L.R.; GRIER, H.J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. **Integrative and Comparative Biology**, v.44, p.333-348, 2004.

PAULETE, J.; BEÇAK, W. Técnicas de Citologia e Histologia. 2 Vols. São Paulo: **Livros Técnicos e Científicos**, 1976.

PENHA, A. S. C. Diversidade genética e morfométrica de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) em drenagens do estado do Maranhão. Dissertação (**Mestrado em Biodiversidade e Conservação**). Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís (MA), 2014.

POLEKSIĆ, V.; MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic

effects of pollutants on freshwater fish. **Oxford: Fishing News Books**. cap.30, p.339-352, 1994.

PRODOCIMO, V.; FREIRE, C.A. Glomeruli and renal tubules are restricted to the cranial kidney of the adult estuarine *Sphaeroides testudineus*. **Journal of Fish Biology**. v.63, p.1258-1265, 2003.

QIAO, M.; YING, G.-G.; SINGER, A.C.; ZHU, Y.G. Review of antibiotic resistance in China and its environment. **Environment International**. v.110, p.160–172, 2018.

RAHMAN, M.M.; JO, Q.; MILLER, S.A.; HOSSAIN, M.Y. A comparative study of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and calbasu (*Labeo calbasu* Hamilton) on bottom soil resuspension, water quality, nutrient accumulations, food intake and growth of fish in simulated rohu (*Labeo rohita* Hamilton) ponds. **Aquaculture**. v.285, p.78-83, 2008.

RAKOCY, J.E.; MASSER, M.P.; LOSORDO, T.M. Recirculating aquaculture tank production systems: aquaponics – Integrating fish and plant culture. **SRAC publication**. v.454, p. 1-16, 2006.

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. **CBP**. v.124, p.62, 2002.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TABATA, Y.A.; EIRAS, A.C.das. Hematologia comparada entre diploides e triploides de truta arco-íres, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Pisces, Salmonidae). **Revista brasileira Zoologia**. v.15, p.1093-1102, 1998.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I., **Métodos para análise hematologia de peixes**. 1 ed. Editora da Universidade Estadual de Maringá, 142p., 2013.

REICHERT, G.; HILGERT, S.; FUCHS, S.; AZEVEDO, J.C.R. Contaminantes emergentes e resistência a antibióticos nas diferentes matrizes ambientais da América Latina. **Meio Ambiente. Poluição**. v.255, p.113140, 2019.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, P. M.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R. W. Distribution of oxitetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p.3883-3890, 2000.

ROTTA, M.A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Embrapa Pantanal. Documentos**, 53. Corumbá: Embrapa Pantanal, 48p., 2003.

RUIZ, M.L.; OWATARI, M.S.; YAMASHITA, M.M.; FERRAREZI, J.V.S.; GARCIA, P.; CARDOSO, L.; MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P. Histological effects on the kidney, spleen, and liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed different concentrations of probiotic *Lactobacillus plantarum*. **Tropical Animal Health and Production**. v.52, p.167-176, 2020.

SABRI, N.A.; SCHMITT, H.; ZAAN, B.V.; GERRITSEN, H.W.; ZUIDEMA, T.; RIJNAARTS, H.H.M.; LANGENHOFF, A.A.M. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v.8, 2018.

SATAKE, F.; BENITES DE PÁDUA, S.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Amapá: **Embrapa**. Cap. 13, p. 330-345, 2009.

SAYED, N.K.; SAFER, A.M. Renal haemopoietic tissue of the mudskipper *Periophthalmus koelreuteri* (Pallas). **Journal of Morphology**. v.213, p.173-178, 2009.

SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; LARSEN, J. L. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.5675-5692, 2001.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.26, p.43-56, 2002.

SCHUSTER, V.L.; SELDIN, D.W. Renal clearance. In: SELDIN D.W.; GIEBISCH G. (Eds). **The kidney, physiology and pathophysiology**. New York: Raven Press, p.365-395, 1985.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. v.6, p. 75-86, 1997.

SEIXAS, F.; PIRES, M.A.; GARTNER, F. **Atlas de patologia veterinária – Biopatologia**. Ed. 2, Lisboa, v.1, p.157-171, 2004.

SERIANI, R.; MOREIRA, L.B.; ABESSA, D.M.S.; ABUJAMARA, L.D.; CARVALHO, N,S,B; MARANHO, L.A.; KIRSCHBAUM, A.A.; RANZANIPAIVA, M.J.T.. Hematological analysis of *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Scianidae, from two Estuaries of Baixada Santista, **Brazilian Journal of Oceanography**. v.58, p. 87-92, 2010.

SIEBER, G.; BEISSER, D.; BOCK, C.; BOENIGK, J. Protistan and fungal diversity in soils and freshwater lakes are substantially different. **Scientific Reports**. v.10, p.1–11, 2020.

SILVA, A.G. Análise de parâmetros morfológicos de curimbas, *Prochilodus lineatus*, submetidos a testes *in situ*, para o monitoramento ambiental. **Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas)** - Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2001.

SOUSA, D.B.P.; ALMEIDA, Z.S.; CARVALHO-NETA. R.N.F. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da Costa Maranhense, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, p.369-376, 2013.

SOUSA, A.T.H.I.; MAKINO, H.; BRUNO, V.C.M.; CANDIDO, S.L.; NOGUEIRA, B.S.; MENEZES, I.G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V. Perfil de resistência antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de animais domésticos e silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.2, p.584–593, 2019.

SOUZA, V.L.; SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; URBINATI, E.C. Manejo alimentar e tempo de residência da água em viveiros de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.01, p.115-121, 2000.

SULTAN, I.; RAHMAN, S.; JAN, A.T.; SIDDIQUI, M.T.; MONDAL, A.H.; HAQ, Q.M.R. 2018. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. **Frontiers in Microbiology**. v.9, p.1–16, 2018.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology normal and pathological features**. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995.

TAVARES–DIAS, M.; RUAS DE MORAES, F. **Livro de hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: M.Tavares-Dias, p.144, 2004.

TURNIPSEED, S.B., STOREY, J.M., WU, I.L., ANDERSEN, W.C., MADSON, M.R. Extended liquid chromatography high resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug, pesticide and human pharmaceutical residues in aquaculture fish. **Food Additives Contaminants Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**. p.1–14, 2019.

UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSP, W.S.; MATUSHIMA, E.R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.34, p.270, 1997.

UNESCO. Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring. **Manuals and Guides: IOC – Intergovernmental Oceanographic Commission**. 53p., 1983.

VILELA, D.A.R., SILVA, S.G.B., PEIXOTO, M.T.D., GODINHO, H.P., FRANÇA, L.R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**. v.28, p.187-190, 2003.

VITOUSEK, P.M.; MOONEY, H.A.; LUBCHENCO, J.; MELILLO, J.M. Human Domination of Earth Ecosystems. **Science**. v.278, p.494-499, 1997.

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

WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia production systems in the americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**. v.10, p. 465-498, 2002.

WEINREB EL. Studies on the fine structure of teleost blood cells. I. Peripheral blood. **Anatomical Record**. v.147, p. 219-238, 1963.

WENDELAAR BONGA, S.E. Hormonal responses to stress | Hormone Response to Stress. **Encyclopedia of Fish Physiology**. 2011.

ZAVALA-CAMIN, L.A., **O planeta água e seus peixes**. 1.ed. Santos: Comunicar, 326 p., 2004.

ZHANG, W.; XIA, S.; ZHU, J.; MIAO, L.; REN, M.; LIN, Y.; GE, X.; SUN, S. Growth performance, physiological response and histology changes of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* exposed to chronic ammonia. **Aquaculture**, v.506, p.424-436, 2019.

ZUASTI, A.; FERRER, C. Granulopoiesis in the head kidney of *Sparus auratus*. **Archives of Histology and Cytology**. v.51, p.425-531, 1988.

APÊNDICE A

Tabela 1: Intervalos de referência de hematologia para tilápias.

Variáveis	Valores de referência	Autor
Ht (%)	27-37	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	27,85±1,65	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
Hb (g.dL ⁻¹)	7,0-9,8	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	7,04±0,38	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
RBC (Erix10 ⁻⁶ µL)	1,91-2,83	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	2,35±0,12	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
VCM (fL)	115-183	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	118,6±3,53	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
HCM (pg)	28,3-42,3	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	30,31±1,64	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
CHCM (g.dL ⁻¹)	22-29	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	25,78±1,72	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**

* Valores mínimos e máximos para híbridos (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus* x *O. aureus*) produzidas em sistema de alta densidade. ** Valores médios ± DP (*Oreochromis niloticus*).

Tabela 2: Intervalos de referência de leucograma para tilápias (*Oreochromis niloticus*).

Variáveis	Valores de referência	Autor
WBC	21,56-154,60 (/µL)	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	16,08 (x10 ³ /mm ³)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
Linfócitos	43,42 (%)	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	6,78-136,39 (/µL)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
	6.747,54±408,09 (/mm ³)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
Monócitos	6,37 (%)	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	400-4.286 (/µL)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
	1105,93±208,79 (/mm ³)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
Neutrófilos	50,08 (%)	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	557-9.873 (/µL)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
	8.200,33±844,92 (/mm ³)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
Eosinófilos	0,04 (%)	(Hrubec <i>et al.</i> , 2000)*
	35-1.645 (/µL)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**
	6,25±4,10 (/mm ³)	(Ueda <i>et al.</i> , 1997)**

* Valores mínimos e máximos para híbridos (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus* x *O. aureus*) produzidas em sistema de alta densidade. ** Valores médios ± DP (*Oreochromis niloticus*).

APÊNDICE B

Tukey HSD

Variável dependente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig.	Intervalo de ...
						Limite inferior
Temperatura	3µg	6.5µg	,04682	,11794	,979	-,2623
		10µg	,34045*	,11794	,025	,0313
		Controle	-,23500	,11794	,199	-,5442
	6.5µg	3µg	-,04682	,11794	,979	-,3560
		10µg	,29364	,11794	,069	-,0155
		Controle	-,28182	,11794	,087	-,5910
	10µg	3µg	-,34045*	,11794	,025	-,6496
		6.5µg	-,29364	,11794	,069	-,6028
		Controle	-,57545*	,11794	,000	-,8846
	Controle	3µg	,23500	,11794	,199	-,0742
		6.5µg	,28182	,11794	,087	-,0273
		10µg	,57545*	,11794	,000	,2663
OD	3µg	6.5µg	-,26364	,12181	,142	-,5829
		10µg	,10000	,12181	,844	-,2193
		Controle	-,12273	,12181	,745	-,4420
	6.5µg	3µg	,26364	,12181	,142	-,0557
		10µg	,36364*	,12181	,019	,0443
		Controle	,14091	,12181	,656	-,1784
	10µg	3µg	-,10000	,12181	,844	-,4193
		6.5µg	-,36364*	,12181	,019	-,6829
		Controle	-,22273	,12181	,267	-,5420
	Controle	3µg	,12273	,12181	,745	-,1966
		6.5µg	-,14091	,12181	,656	-,4602
		10µg	,22273	,12181	,267	-,0966

Variável dependente: PH

Tukey HSD

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
3µg	6.5µg	,24318*	,04613	,000	,1223	,3641
	10µg	,16136*	,04613	,004	,0404	,2823
	Controle	,18318*	,04613	,001	,0623	,3041
6.5µg	3µg	-,24318*	,04613	,000	-,3641	-,1223
	10µg	-,08182	,04613	,293	-,2027	,0391
	Controle	-,06000	,04613	,565	-,1809	,0609
10µg	3µg	-,16136*	,04613	,004	-,2823	-,0404
	6.5µg	,08182	,04613	,293	-,0391	,2027
	Controle	,02182	,04613	,965	-,0991	,1427
Controle	3µg	-,18318*	,04613	,001	-,3041	-,0623
	6.5µg	,06000	,04613	,565	-,0609	,1809
	10µg	-,02182	,04613	,965	-,1427	,0991

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

ANOVA

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
LINF	Entre Grupos	24381,583	3	8127,194	87,568	,000
	Nos grupos	4083,667	44	92,811		
	Total	28465,250	47			
NEUTR	Entre Grupos	17538,396	3	5846,132	57,431	,000
	Nos grupos	4478,917	44	101,794		
	Total	22017,313	47			
MON	Entre Grupos	215,167	3	71,722	48,180	,000
	Nos grupos	65,500	44	1,489		
	Total	280,667	47			
EOS	Entre Grupos	,063	3	,021	1,000	,402
	Nos grupos	,917	44	,021		
	Total	,979	47			