

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ASPECTOS DA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE EM
Piaractus mesopotamicus INDUZIDA POR *Aeromonas*
hydrophila

Gustavo da Silva Claudiano
Médico Veterinário

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ASPECTOS DA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE EM
Piaractus mesopotamicus INDUZIDA POR *Aeromonas*
hydrophila

Gustavo da Silva Claudiano

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

Co-orientadoras: Prof^a. Dra. Julieta R. E. Moraes

Prof^a. Dra. Cleni M. M. Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Patologia Animal.

C615a Claudiano, Gustavo da Silva
Aspectos da fisiopatologia da sepse em *Piaractus mesopotamicus*
induzida por *Aeromonas hydrophila* / Gustavo da Silva Claudiano. --
Jaboticabal, 2015
xiii, 94 p.: il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Flávio Ruas de Moraes

Co-orientadores: Julieta Rodini Egracia de Moraes, Cleni Mara
Marzocchi-Machado

Banca examinadora: Aureo Evangelista Santana, Rogério
Salvador, Luiz Lehmann Coutinho, Antonio Vicente Mundim

Bibliografia

1. Endotoxemia. 2. Neuroendócrino. 3. Imunidade inata. 4.
Hormônio. 5. Alterações clínica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616:639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ASPECTOS DA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE EM *Piaractus mesopotamicus* INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila*

AUTOR: GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO

ORIENTADOR: Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA


Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. ROGERIO SALVADOR

Universidade Estadual do Norte do Paraná / Bandeirantes/PR


Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP


Prof. Dr. ANTONIO VICENTE MUNDIM

Universidade Federal de Uberlândia / Uberlândia/MG

Data da realização: 30 de junho de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUSTAVO DA SILVA CLAUDIANO- Natural de São Paulo – SP, nascido em 06 de janeiro de 1984, graduado em Medicina Veterinária em 2008, na Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP, Bandeirantes – PR. Monografia realizada sob orientação do Prof. Dr. Rogério Salvador e co-orientação da Prof^a Dra. Fabiana Pilarsk com o trabalho intitulado de “Avaliação da concentração letal CL 50% (CL (I) (50-96h)) do extrato aquoso de *Terminalia catappa* e sua eficácia em alevinos de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) parasitados por *Monogenea*, *Ichthyophthirius multifiliis* e *Piscinoodinium pillulare*”. Obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Campus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes e co-orientação do Prof^o Dr. Marco Antonio de Andrade Belo, com o trabalho intitulado de “Eicosanóides no aumento de permeabilidade vascular e componentes celulares da inflamação aguda em *Piaractus mesopotamicus*”. Em março de 2011 ingressou no curso de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp Campus de Jaboticabal sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes e co-orientação das Prof^{as}. Dra. Julieta Rodini Egracia de Moraes e Prof^a. Dra. Cleni Mara Marzocchi-Machado.

Dedico,

Agradeço ao grande ARQUITETO do universo que me permitiu ver, admirar na busca de conhecimento do “mistério” da vida, que pode ser visto numa minúscula gota de sangue;

Aos meus pais, **Sebastião** e **Izilda** e avó **Lourdes** (*in memoriam*) que me ensinaram a vida e sempre estão ao meu lado e incentivando;

Aos meus irmãos, **Leonardo** e **Flávia** os quais guardo profunda admiração, orgulho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à,

Meu agradecimento ao grande Arquiteto, por permitir o dom da vida e a iluminar todos os meus caminhos, permitindo que veja sua criação com um novo olhar;

À minha família, em especial meu pai e minha mãe e meus irmãos por sempre encurtarem a distância, permitindo-me transpor os abismos, os medos, as dúvidas e por terem assegurado minha caminhada em todos os momentos;

Ao Prof^o Dr. Flávio Ruas de Moraes, pela amizade, orientação segura, esclarecendo faces e eventos que diversas vezes não havia visto, incentivo, confiança em todos os momentos, dedicação em todas as fases deste trabalho, oportunidade e participação do meu desenvolvimento;

À Co-orientadora Prof^a Dra. Julieta Rodini Engracia de Moraes pela amizade, incentivo, confiança, grande contribuição na formação profissional e pessoal, colaboração em todo o projeto e pela disponibilidade oferecida em experiências profissionais que dificilmente terei novamente;

À Co-orientadora Prof^a Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado pelo conhecimento transmitido, tendo entendido nossa ideia e estar participando do projeto;

Prof^o Dr. Rogério Salvador pela amizade, oportunidades, orientação, colaboração e por sempre estar presente e pronto no atendimento de diversas ocasiões;

Prof^o Dr. Antonio Vicente Mundim por ter disponibilizado seu laboratório, equipe, tempo, conhecimento e estar participando do projeto;

Prof^o Dr. Luiz Lehmann Coutinho pela oportunidade da apresentação, contribuindo e participando de maneira importante e dando uma outra visão;

Prof^o Dr. João Martins Pizauro Júnior e sua equipe pelo pronto atendimento e disponibilidade de tempo, conhecimentos e laboratório;

Prof^o Dr. Áureo Evangelista Santana por sempre estar pronto a participar e contribuir em nossos trabalhos;

A Profa. Dra. Margaret de Castro e ao Sr. José Roberto da Silva Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) responsável pelo Laboratório de Endocrinologia do HC, pelos ensinamentos e processamento das amostras de cortisol;

A Dr^a Renata Miranda e ao Sr. Felipe Cesar Gonçalves da Universidade Federal de Uberlândia pelo acolhimento, tempo, conversas, ideias, ensinamentos e processamento das amostras do bioquímico sérico e dos hormônios tireoidianos;

À Dr^a Elaine Costa pela amizade, participação, ideias, treinamento, esclarecimentos e disponibilidade;

À Ma. Aline Belesini, Ma. Claudenia Ferreira e Dr^a Flávia Carvalho pela amizade, atenção, ajuda indispensável e pronta em diversas etapas deste projeto;

Ao meu amigo Silas Fernandes Eto pelas horas de conversa, companheirismo, diversos ensinamentos, participação de maneira ativa e decisiva em todas as etapas deste trabalho, sempre acreditando, incentivando e ter me dado a chance de participar de seu sonho;

À Dayanne Carla Fernandes pela amizade, ajuda, participação constante, ensinamentos, reconhecimento e por sempre ter me recebido tão bem na sua casa, estendo meus agradecimentos a sua família;

Ao Fausto de Almeida Marinho Neto pelas conversas, ensinamentos, sempre pronta ajuda, disposição e participação em todas as etapas deste trabalho;

Ao Jefferson Yunis Aguinaga e Paulo Fernandes Marcusso pela possibilidade de participar e dividir diversos trabalhos, ensinamentos, conversas, apoio e a pronta disposição sempre;

À Marina Tie Shimada, Isabela Mancini Martins, Thalita Regina Petrillo e Lygia M.M. Malvestio pela amizade, ensinamento, ajuda e conversas;

Aos antigos companheiros de laboratório Marcello Padri, Hurzana de Melo, Fernando Brito, Wilson Gomez e o Prof^o Marco A.A. Belo pelos ensinamentos e ajuda.

Aos companheiros do Caunesp José Dias Neto, Roberson Sakabe, Eduardo Urbinati, Edsandra Chagas e a Prof^a Dr. Fabiana Pilarsk que me orientou no início de minha formação científica

Ao Departamento de Patologia Veterinária meu muito obrigado a Chica, Moema, Mabel, Edgard, Téo e Cristina pela ajuda e conversas;

Aos meus amigos, companheiros de todas as horas de São Paulo: João Daris, Eduardo Daris, Mario Abe, Marcelo Abe, Rodrigo Abe, Edson Siqueira, Thales Licciardi, Thiago Licciardi e Fabio Felício, por apesar do tempo ainda sermos amigos;

Aos meus amigos, companheiros de todas as horas de Jaboticabal: Anderson da Silva (e família), Lucas Braos (e diversos ensinamentos), Juan Lopes, Fabio Travassos, Marcos Borges, Ronny Barbosa, Thiago Ibiapina, Felipe Batistela, João Alencar, Paulo Martins, Felipe Lucio, Elcides Rodrigues, Matheus Godoy, Antônio Loureiro (e família), Marcos Oliveira, Anildo Caldas, Rafael Marini, Edvilson, Diego Alves Batistela, Ketherson Silva, Thiago Sylvestre, Flávio Batistela, Bruno Braos e Eduardo (*in memoriam*) pelas várias e várias horas de conversas, apoio e bebedeiras;

Aos meus amigos, companheiros de Bandeirantes/PR: Raphael Lima, Cleber Fernandes, David Gabriel, Diogo Silva, Marlon Romanini, Cristiano Lopes, Diego Rocha, Igor Rubens, Marcio (*in memoriam*) pela amizade e companheirismo.

À Fátima Dores, Juliana S. Vantini, Lucília da Costa, Helen Gonçalves, Vanja Gondim, Flávia Campos, Ana Buzinari, Agda Facincani, Raquel Santos, Bruna Agy Loureiro, Carol Nogueira, Rose Tavares Moraes, Daniele Araujo, Ângela Coelho, Julie Amorim, Tamiris Kempner, Bruna Telles, Maira Costa, Ludmila Souza, Fabiana Cirino e Aline Lopes pela amizade, companheirismo e diversos momentos de descontração;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado (Processo nº 2011/20280-2) e pelo auxílio regular do projeto de Pesquisa (Processo nº 2014/10231-2) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão do auxílio à pesquisa (Processo nº 441054/2014-5).

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo de busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução e Fundamentação teórica | 01 |
| 2. Objetivos | 10 |
| 2.1 Objetivo geral | 10 |
| 2.2 Objetivos específicos | 10 |
| 3. Material e Métodos | 11 |
| 3.1 Peixes e delineamento experimental..... | 11 |
| 3.2 Obtenção da bactéria | 12 |
| 3.3 Determinação da DL50% (DL (I) (50-96H)) para inóculo bacteriano | 13 |
| 3.4 Indução da sepse por <i>Aeromonas hydrophila</i> e coleta de sangue..... | 14 |
| 3.5 Determinação da concentração sérica de hormônios | 14 |
| 3.5.1 Determinação da concentração de cortisol sérico..... | 14 |
| 3.5.2 Determinação da concentração sérica dos hormônios tireoidianos | 15 |
| 3.6. Variáveis clínicas laboratoriais..... | 15 |
| 3.6.1 Hemograma | 15 |
| 3.6.2 Perfil Bioquímico sérico | 16 |
| 3.6.3 Glicemia | 17 |
| 3.6.4 Tempo de coagulação ativa | 17 |
| 3.6.5 Quantificação bacteriana no sangue | 17 |
| 3.7 Avaliação da imunidade inata..... | 17 |
| 3.7.1 Concentração de espécies reativas do oxigênio em leucócitos no sangue | 17 |
| 3.7.2 Atividade lítica do soro | 18 |
| 3.7.3 Determinação da concentração de lisozima sérica | 19 |
| 3.7.4 Atividade de aglutinação bacteriana..... | 19 |
| 3.8 Avaliação dos sinais clínicos e análise da sobrevivência..... | 20 |
| 3.9 Análise estatísticas..... | 20 |
| 4. Resultados | 21 |
| 4.1 Concentração sérica de hormônios | 21 |
| 4.1.1 Concentração de cortisol sérico | 21 |
| 4.1.2 Concentração dos hormônios tireoidianos..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. Variáveis clínicas laboratoriais..... | 23 |
| 4.2.1 Hemograma | 23 |
| 4.2.2 Perfil Bioquímico sérico | 26 |
| 4.2.3 Glicemia | 27 |
| 4.2.4 Tempo de coagulação ativa | 28 |
| 4.2.5 Quantificação bacteriana no sangue | 29 |
| 4.3 Avaliação da imunidade inata..... | 29 |
| 4.3.1 Surto oxidativo de leucócitos no sangue | 29 |
| 4.3.2 Atividade lítica do soro | 30 |
| 4.3.3 Quantificação da lisozima sérica | 31 |
| 4.3.4 Atividade de aglutinação bacteriana..... | 32 |
| 4.4 Avaliação dos sinais clínicos e sobrevida..... | 33 |
| 6. Discussão | 35 |
| 7. Conclusões..... | 46 |
| 8. Bibliografia | 48 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Concentração sérica de cortisol em pacus..... | 21 |
| Figura 2 – Concentração sérica de T ₃ | 22 |
| Figura 3 – Concentração sérica de T ₄ | 23 |
| Figura 4 – Células sanguíneas de pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) inoculados com <i>Aeromonas hydrophila</i> | 25 |
| Figura 5 – Anomalias morfológicas de células sanguíneas de pacus inoculados com <i>Aeromonas hydrophila</i> | 26 |
| Figura 6 – Glicemia | 28 |
| Figura 7 – Teste de coagulação ativa | 28 |
| Figura 8 – Quantificação bacteriana no sangue..... | 29 |
| Figura 9 – Concentração de espécies reativas de oxigênio de leucócitos sanguíneos..... | 30 |
| Figura 10 – Atividade lítica do soro. | 31 |
| Figura 11 – Curva de calibração para determinação da concentração de lisozima sérica e sua quantificação. | 32 |
| Figura 12 – Valores dos títulos de anticorpos naturais..... | 33 |
| Figura 13 – Sobrevida após indução da sepse grave. | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Valores médios ¹ (respectivos erros padrão) e análise de variância para variáveis do hemograma em <i>P. mesopotamicus</i> desafiados com <i>A. hydrophila</i> | 24 |
| Tabela 2 – Valores médios ¹ (respectivos erros padrão) e análise de variância para valores séricos do sangue - pacus normais e inoculados com <i>A. hydrophila</i> em diferentes tempos | 27 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAB – Atividade de aglutinação bacteriana
ALS – Atividade lítica do soro
ALT – Alamina aminotransferase
AST – Aspartato aminotrasferase
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
CK – Creatina fosfoquinase
DL – Dose letal
DMF – N, N- dimetilformamida
DNA – Ácido desoxirribonucleico
 Δ DO – Densidade óptica inicial menos densidade óptica final
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay/Imunoensaio enzimático
ERO – Espécie reativa de oxigênio
FA – Fosfatase Alcalina
GGT – γ -Glutamilttransferase
Hb – Hemoglobina
HCM – Hemoglobina corpuscular média
HDL– Lipoproteína de alta densidade
HPI – Horas pós-indução
Ht – hematócrito
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
LDH – Lactato desidrogenase
LPS – Lipopolissacarídeo
NBT – Nitrobluetetrazolium
ON – Óxido nítrico
PAF – Fator ativador de plaquetas
PGI₂ – Prostaciclina
PMA – Forbol-12-Miristato-13-Acetato
PPT – Proteína plasmáticas totais
RNA – Ácido ribonucléico

SDMO – Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TSA – Ágar tríptico de soja

TSB – Caldo tríptico de soja

TSH – Hormônio tíreo-estimulante

T₃ – Triiodotironina

T₄ – Tiroxina

UFC – Unidade formadora de colônia

VCM – Volume corpuscular médio

ASPECTOS DA FISIOPATOLOGIA DA SEPSE EM *Piaractus mesopotamicus* INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila*

RESUMO - A patogenia da sepse envolve múltiplas inter-relações na dinâmica entre os diversos componentes relacionados ao hospedeiro e ao patógeno, com altas taxas de mortalidade em várias espécies animais. Embora seja uma das principais causas de mortalidade de peixes, há escassez de literatura sobre seus fenômenos fisiopatológicos e em seus mecanismos de modulação. Assim, neste trabalho, objetivou-se estudar os aspectos fisiopatológicos da evolução da reposta séptica induzida por *Aeromonas hydrophila* em *Piaractus mesopotamicus* – pacus. O inóculo utilizada foi determinada pela DL50 (DL50-96h) e estimada em $1,78 \times 10^9$. A sepse foi induzida pela inoculação na cavidade celomática e seguiram-se as coletas de sangue nos tempos pré-determinados de 1, 3, 6 e 9 horas após indução e o grupo controle. Verificou-se rápido aumento da cortisolemia com inibição da absorção de glicose, seguido de hipocortisolemia e hiperglicemia. Os hormônios da tireoide, apresentando diminuição imediata de suas concentrações séricas T₃ e T₄. Este último apresentou aumento 6 HPI. As alterações hormonais induzidas pela sepse desencadearam alterações nas vias metabólicas com aumento do catabolismo protéico e lipídico, utilização da via da glicólise anaeróbica transitória e lesão hepática. O leucograma demonstrou leucopenia e trombocitopenia seguido de cessar da quimiotaxia dos leucócitos após 6 HPI e graves alterações morfológicas em leucócitos e eritrócitos. As variáveis do sistema imune inato apresentaram aumento da produção de EROs 3 HPI, seguido de diminuição, sem alteração da concentração da lisozima sérica e progressivo aumento do ALS e AAB. Após inoculação ip. de *A. hydrophila*, foram evidenciados sinais clínicos de aeromonose, bacteremia crescente e sobrevida de 57,14 % depois 36 HPI.

Palavra-chave: endotoxemia, neuroendócrino, imunidade inata, hormônios, alterações clínicas

ASPECTS OF THE PATHOPHYSIOLOGY OF SEPSIS IN *Piaractus mesopotamicus* INDUCED *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT - The pathogenesis of sepsis involves multiple interrelationships in the dynamics between various components related to the host and the pathogen, with high mortality rates in several animal species. Although it is a major cause of fish deaths, there is lack of literature about its physiopathology and the mechanisms of modulation. This work aimed to study the physiopathological aspects of the evolution of the septic response induced by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus* - pacu. The dose was determined by the LD50 (LD50-96h) and estimated in $1,78 \times 10^9$. Sepsis was induced by the administration in the coelomic cavity and was followed by the collection of blood in the pre-determined times of 1, 3, 6, and 9 hours after induction and more control. There was a rapid increase of cortisol concentration in plasma, inhibition of glucose uptake, followed by hypocortisolemia and hyperglycemia. Thyroid hormones have immediate reduction of serum concentration of T₃ and T₄. The latter showed an increase after 6 HPI. Hormonal changes induced by sepsis-triggered changes in metabolic pathways enhancing protein and lipid catabolism, use of transient anaerobic glycolysis via and liver damage. The leucocyte count showed leukopenia and thrombopenia followed by cessation of leukocyte migration after 6 HPI and severe morphological changes in leukocytes and erythrocytes. The innate immune variables showed increased production of ROS after 3 HPI, followed by reduction without changing the concentration of serum lysozyme and progressive increase in SHA and ABA. After ip inoculation of *A. hydrophila* in pacu, clinical signs were evident of *Aeromonas* infection, growing bacteremia and survival of 57,14 % after 36 HPI.

Keyword: endotoxemia, neuroendocrine, innate immunity, hormones, clinical changes

1. Introdução e Fundamentação teórica

A piscicultura apresenta notável crescimento mundial. Atualmente o Brasil tem um PIB pesqueiro de R\$ 5 bilhões, mobilizando 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores, proporcionando 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos (BRASIL, 2014).

O país apresenta potencial para aquicultura, pois existem mais de 3,5 milhões de hectares de lâmina d'água em reservatórios de usinas hidrelétricas (ANEEL) e propriedades particulares no país. Ainda conta com 13 % da água doce do mundo e uma extensa área marinha passível de uso sustentável para a produção em cativeiro (BRASIL, 2014).

Em 2011, a produção aquícola nacional foi de 628.704,3 t, com incremento de 31,1% em relação à produção de 2010. Dentre os peixes mais criados em águas continentais, as tilápias e os peixes redondos (pacu, tambaqui e tambacu) são os de maior importância, pois juntos somaram 436.415,5 t ou 80,1% da produção nacional de piscicultura no ano de 2011 (BRASIL, 2011). A média de consumo nacional de pescado por habitante alcançou 11,7 kg em 2011, que significaram 23,7% de aumento na demanda em relação aos dois anos anteriores (BRASIL, 2014).

Os recursos naturais e o aumento do consumo interno e externo mostram que o país tem todas as condições necessárias para se competir com produtores da Índia, Noruega, Chile e China, segundo estudo do banco Rabobank publicado no início de 2013 (MELO e NIKOLIK, 2013).

Apesar destes fatores, a balança comercial do país tem saldo negativo, pois aproximadamente 60% do pescado consumido no país é importado (PIOTO, 2014). As importações de pescado contribuíram com 323 mil toneladas entre 2005 e 2010, ou 50% do crescimento da demanda brasileira no período de acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2014).

Outra fonte de pescado é a pesca extrativista que tange uma questão bastante importante, que é a biodiversidade de espécies, que se não for respeitada sofrerá a redução do número de espécies continentais e marinhas, como já acontece com lambari, cascudo, surubim, pacu e sardinha (IBAMA, 2013).

Todas estas questões comerciais e ambientais impulsionam e culminam na intensificação dos sistemas de produção aquícola, com aumento da incidência e severidade de várias doenças. Entre as doenças infecciosas de peixes, as de origem bacteriana apresentam maior significância em criações intensivas com altas taxas de mortalidade (SCORVO-FILHO et al., 2004; MORAES e MORAES, 2009).

Estudos epidemiológicos da frequência de casos sépticos constataam que as bactérias Gram negativas são as de maior prevalência e principais responsáveis pela mortalidade em pacientes humanos (SALES et al., 2006), cães (LAFORCADE et al., 2003) e em peixes (MORAES e MARTINS, 2004).

Os efeitos deletérios de bactérias Gram negativas são principalmente consequência da liberação de endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS), que desencadeiam a sepse e/ou endotoxemia, síndromes complexas, definidas pela presença de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) à infecção e uma das principais causas de mortalidade no homem e nos animais (RAU et al., 2007). Esta resulta da exacerbada e descontrolada liberação de mediadores químicos pró e anti-inflamatórios com papel central nos fenômenos fisiopatológicos do processo (OBERHOLZER et al., 2001; LEVY et al., 2003; KEEL e TRENTZ, 2005; CONTRAN et al., 2010).

Acredita-se que o início e a progressão da sepse ocorram pela “desregulação” da resposta normal, com maciça e descontrolada ativação de células inflamatórias, resultando numa anarquia metabólica, na qual “o próprio organismo não consegue controlar o que ele próprio criou” (BONE, 1991). Assim, a sepse é uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica, que tem como fator etiológico uma infecção (KNOBEL, 2006).

Devido à diversidade de graus de severidade e variedade clínica o *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM, 1999) estabeleceram algumas definições. Infecção é a resposta inflamatória à presença de microrganismos ou à invasão de tecidos normalmente estéreis por estes organismos; bacteremia é a presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea; síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) é uma resposta inflamatória manifestada por duas ou mais das seguintes condições: 1) temperatura > 38 °C ou < 36 °C; 2) frequência cardíaca > 90 bpm; 3) frequência respiratória > 20 mpm ou pCO₂ < 32 mmHg;

4) contagem de glóbulos brancos $> 12.000/ \text{mm}^3$ ou $< 4.000/ \text{mm}^3$ ou bastonetes $> 10\%$; sepse é a resposta inflamatória à infecção mais a presença de microrganismos viáveis na corrente sanguínea; sepse grave (severa) é a sepse associada às disfunções orgânicas, hipoperfusão ou hipotensão; choque séptico é o estado no qual o paciente apresenta falência circulatória aguda caracterizada por hipotensão arterial persistente não responsiva a vasoconstritores e a reposição de fluidos; síndrome da disfunção múltipla de órgãos (SDMO) é a presença da alteração das funções orgânicas em paciente agudamente enfermo, de modo que a homeostasia não possa ser mantida sem suporte avançado de vida (BONE et al., 1991).

O processo séptico tem sua origem a partir do contato do organismo com componentes microbianos que ativam o sistema de defesa, o qual, por sua vez, é responsável pela liberação de mediadores inflamatórios (MADDEN et al., 1989; NDUKA e PARRILLO, 2011). Nesse sentido, citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, são inicialmente produzidas no sítio de infecção, favorecendo a ativação e a quimiotaxia de células do sistema de defesa (FRACASSO, 2008).

A sequência de eventos tem início quando os componentes da parede bacteriana, endotoxinas em Gram negativos e/ou o ácido teicóico em Gram positivos são reconhecidos por macrófagos, monócitos e outras células mononucleares, desencadeando a cascata inflamatória (LYNN e GOLENBOCK, 1992; IMMENSCHUH et al., 2000; CINEL e DELLINGER, 2007). A interação do macrófago com a endotoxina é, provavelmente, o principal fator de resposta inflamatória e do choque endotóxico (CIANCIARULLO et al., 2008), sendo o principal receptor é o CD14, que é uma glicoproteína, presente na superfície de macrófagos e monócitos (AMERSFOORT et al., 2003; UEMATSU e AKIRA, 2007).

Decorrente disso, há a liberação do TNF- α que estimula intensa resposta celular, com ativação de leucócitos, liberação de mediadores secundários e quimiotaxia (SALLES, et al., 1999; BENJAMIM, 2000). Os mediadores secundários como citocinas (IL-1, IL-6, IL-8), fatores do complemento, eicosanoides, PAF, ERO, ON e outros, são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando um ciclo vicioso inflamatório (CARVALHO e TROTTA, 2003).

As consequências desta resposta inflamatória exacerbada e descontrolada são o comprometimento de órgãos e a evolução para o choque e a síndrome da insuficiência múltipla dos órgãos, que é acompanhada de alta mortalidade (SALLES, et al., 1999).

A identificação da função de mediadores desencadeadores sobre o sistema de coagulação, variáveis hematológicas e bioquímicas, imunidade inata, modulação inflamatória, entre outros, são de grande interesse, porque estão envolvidos na perda da homeostase orgânica e, conseqüentemente, dos eventos que culminam com o choque séptico e a hipotensão causadora da morte decorrente do colapso cardíaco (CONTRAN et al., 2010).

Outros eventos são cruciais no cenário da sepse, como a falência na quimiotaxia de leucócitos, particularmente de neutrófilos, relacionada com níveis elevados de citocinas na circulação durante a endotoxemia (RIOS-SANTOS et al., 2006), e uma imunossupressão com menor expressão de citocinas pró-inflamatórias de linfócitos e outros leucócitos em estágio finais do quadro séptico (RUSSEL, 2006), que acarreta inabilidade para combater infecções e predisposição a infecções nosocomiais (HOTCHKISS e KARL, 2003). A falência da atividade quimiotóxica de neutrófilos ocorre como decorrência de fenômenos multifatoriais (BENJAMIN et al., 2000; ALVES-FILHO et al., 2009; SECHER et al., 2009).

Mesmo com os conhecimentos sobre as alterações fisiopatológicas que ocorrem na sepse e no choque séptico, estes casos continuam a apresentar altas taxas de mortalidade em pacientes humanos e em diferentes espécies animais (SALLES, et al., 1999; MARTIN et al., 2003; PADKIN et al., 2003).

A patogenia da sepse envolve múltiplas inter-relações entre componentes do hospedeiro e do patógeno (BOCHUD e CALANDRA, 2003; NDUKA e PARRILLO, 2011). Com o desenvolvimento de técnicas biomoleculares, imunológicas e farmacológicas surgiram novas perspectivas para a elucidação dos processos e possíveis tratamentos da sepse. Dentre estes se destacam os anticorpos específicos, antagonistas de receptores de citocinas pró-inflamatórias e moléculas recombinantes, que bloqueiam e/ou sintetizam a ação dos principais mediadores desencadeadores da sepse, tais como o anti TNF- α , antagonista de receptores para IL-1, bloqueadores da produção de óxido nítrico (ON) e genes recombinantes de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, dentre

outros (WAKABAYASHI et al., 1991; DINARELLO et al., 1997a; PITTET et al., 1999; GARCIA-CASTILLO et al., 2004; GRAYFER et al., 2008; DESCAMPS et al., 2012; GOH et al., 2013, WANG et a., 2013; PLEIC et al., 2014).

Apesar da identificação de diferentes mediadores químicos envolvidos na sepse, o foco das pesquisas é dirigido principalmente ao TNF- α seguido de IL-1, considerados mediadores centrais do processo (SALLES, et al., 1999). No entanto, os resultados mostram que não há melhora significativa do quadro mórbido de pacientes sépticos após a utilização de inibidores dos efeitos destas citocinas (WAKABAYASHI et al., 1991; PITTET et al., 1999; GOH et al., 2013).

Importante destacar que há controvérsias quanto à participação das citocinas em diferentes espécies animais e entre modelos experimentais empregados no estudo da sepse. Tratamento com anticorpo anti TNF- α não alterou a sobrevida de ratos com peritonite (BAGBY et al., 1991, CARVALHO e TROTTA, 2003). Por outro lado, o pré-tratamento com anti TNF- α aumenta a sobrevida dos animais na endotoxemia, ao passo que seu efeito é deletério em modelo com ligação e perfuração do ceco não letal, com aumento da taxa de mortalidade (ZANETTI et al., 1992, GOH et al., 2013).

O aumento da expressão de IL-1 causa maior produção de ON e prostaglandina que induzem vasodilatação periférica (KLARESKOG et al., 2009). Contudo, a utilização de antagonista de receptor IL-1 em pacientes com sepse não alterou a hemodinâmica (OPAL et al., 1997; DINARELLO, 2001b) e piorou o quadro clínico (GLAUSER, 2000; CARVALHO e TROTTA, 2003).

As diferenças na modulação da sepse e choque séptico por citocinas são amplamente apresentados na literatura, porém controversos. Estas controvérsias são fruto do entrelaçamento na rede das citocinas intimamente ligadas ao aparecimento e evolução de disfunções e lesões de diversos órgãos, em diferentes estágios da sepse e para diferentes patógenos. Estes fenômenos dificultam o estudo da sepse, não somente por restrições e princípios éticos, como estabelecer comparação entre grupos, espécies, idade, sexo, estado imunitário, nutricional, endócrino, grande variedade de microorganismos patogênicos e oportunistas, modelos e tempos de avaliação.

Atualmente os modelos experimentais mais utilizados no estudo da sepse são a técnica de ligação e perfuração do ceco que apresenta maior analogia à

forma humana de sepse (BENJAMIM et al., 2000; TORRES-DUENAS et al., 2006); os modelos baseados na administração de endotoxinas bacterianas (LPS de bactérias Gram negativas) (ALEXANDER et al., 2001) ou exotoxinas produzidas por bactérias Gram positivas (CALANDRA et al., 2001) e a aplicação de patógeno vivo em cavidades (MORAES et al., 2000; GARCIA e MORAES, 2009).

Indiferente ao modelo e da espécie bacteriana, os animais endotérmicos, como os mamíferos, são sensíveis à endotoxina, mesmo em doses baixas, mas, os vertebrados ectotérmicos, como os peixes são considerados tolerantes ao choque endotóxico (WEDEMEYE et al. 1968; WEDEMEYE et al. 1969; ILIEV et al., 2005; MACKENZIE et al., 2009). Todavia, a endotoxina ou LPS é apontada, muitas vezes, como responsável pela patogenicidade de várias doenças bacterianas, especialmente de origem Gram negativa em peixes (RODKHUM et al., 2006). Todavia, entre teleósteos há diferenças entre as espécies quanto à tolerância à sepse (NAYAK et al., 2008). Wedemeyer et al. (1968) observaram que *Oncorhynchus kisutche*, *O. mykiss*, são resistentes à *Aeromonas salmonicida*, e *Salmo salar* desafiado com a mesma bactéria apresentou aumento da taxa de anticorpos específicos com aumento da sobrevivência (ALBERT et al., 1998).

Alguns autores atribuem a resistência a uma hiper-resposta ao estímulo primário, enquanto a estimulação subsequente poderia causar resposta mínima ou nenhuma resposta (NAYAK et al., 2008). Essa segunda resposta mais baixa seria decorrente da menor habilidade dos macrófagos em produzir IL-1 e TNF- α e/ou por possuírem menor quantidade de receptores para o complexo LPS (ILIEV et al., 2005; NAYAK et al., 2008).

A tolerância atribuída aos peixes reporta-se à endotoxemia, mas não à septicemia. Na literatura, há relatos de casos de graves alterações morfológicas, com altas taxas de mortalidade em diferentes espécies de teleósteos acometidos por bacterioses Gram positivas e Gram negativas (MURATORI et al., 2001; DA SILVA, 2010; PÁDUA et al., 2010; SALVADOR et al., 2005).

As controvérsias acima verificadas em teleósteos podem ser explicadas pelo tipo de modelo empregado nos ensaios. Aplicação de LPS na cavidade celomática de teleósteos é o modelo mais utilizado em peixes (WEDEMEYER

et al. 1968, ILIEV et al., 2005). O LPS é um potente estimulador do sistema imune inato-adaptativo, por ser lipopolissacarídeo com uma porção polissacarídica altamente variável e uma região lipídica, constituída de ácido graxo tóxico denominado lipídio A (ERRIDGE et al., 2002). Assim o foco dos estudos em teleósteos se concentram principalmente nos efeitos do LPS em relação as variáveis, como a concentração de lisozima, atividade do sistema complemento, produção espécies reativas do oxigênio (EROs), de mieloperoxidase, de alterações hematológicas, da produção anticorpos e da atividade fagocitária e raras alterações na taxa de sobrevivência relativa (PAULSEN et al., 2003; SELVARAJ te al., 2006; NAYAK et al., 2008; SWAIN et al., 2008).

Desafios com LPS descartam outras características intrínsecas das bactérias, como diversos fator de virulência e de patogenicidade excretadas, além de outros constituintes de membrana, selecionando apenas partes de uma síndrome complexa e multifatorial que ocorre durante a infecção.

Não existe o modelo ideal (HOTCHKISS e KAR, 2003). A inoculação direta do patógeno nas diferentes cavidades intensifica a patogenicidade, uma vez que alguns mecanismos da imunidade inata não são considerados, como a barreira física (escamas e pele), muco de pele e brânquias que contem lisozima, complemento, peptídeos antibacterianos e imunoglobulinas IgM (BOSHRA et al., 2006), e na epiderme células de defesa como linfócitos, macrófagos e eosinófilos (ELLIS, 2001; FISCHER et al., 2006) e o número de organismo invasores é, muitas vezes superior ao que ocorre naturalmente.

Dentre as bactérias utilizadas em modelos experimentais de inflamação em peixes são as do gênero *Aeromonas* (BOZZO et al., 2007; GARCIA e MORAES, 2009; CLAUDIANO et al., 2013), que são agentes infecciosos cosmopolitas, encontradas em fontes naturais de água, no solo e em animais de água doce (DAVIS et al., 1990). As septicemias causadas por *Aeromonas* são relatadas em todas as espécies de água doce (HOLLIMAN, 1993). Os fenótipos de *A. hydrophila* representam ameaça significativa para a saúde pública em diversas partes do mundo (CHOPRA et al., 2004), como agente etiológico de várias doenças, inclusive em seres humanos, tais como gastroenterite, síndrome urêmica hemolítica, infecções causadoras de feridas, como a celulite, mionecrose, necrose gangrenosa e septicemia (JANDA e

ABBOTT, 1998), são frequentemente relacionadas com alta taxas de mortalidade e isoladas de surtos sépticos em peixes tropicais (CIPRIANO, 2001; MORAES e MARTINS, 2004). Estas bactérias são Gram negativas, não encapsuladas, com respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa, têm forma de bastonete móvel, possuem flagelos polares e não produzem esporos (STOSKOPF, 1993).

Por ser Gram negativa possui LPS, o qual é descrito como potente quimiotático de leucócitos e indutores do choque séptico, tanto em mamíferos como em peixes (NAYAK et al., 2008; ABBAS, 2014). Além disso a *A. hydrophila* produz endo e exotoxinas, como hemolisina (HOWARD e BUCKLEY, 1985; CHOPRA et al., 2000), enterotoxinas (SHOTTS et al., 1985; DEL CORRAL, 1990) e fator dermonecrótico e outras proteases que causam rompimento das membranas celulares (SHOTTS et al., 1985).

Em teleósteos, a sepse por *Aeromonas hydrophila* causa hemorragia cutânea e nas nadadeiras, progredindo para ulcerações com perda de epitélio (BOIJINK e BRANDÃO, 2001; GARCIA e MORAES, 2009). Em pacus, inoculados com doses crescentes de *A. hydrophila*, constatou-se, além destes sinais, o aparecimento de sintomas nervosos associados à natação errática “nado em círculos” e/ou “rodopio”, com alterações histopatológicas com hemorragia, edema, infiltrado inflamatório e aumento da produção de iNOS (CLAUDIANO et al., 2014). Resultados anteriores deste laboratório também demonstraram que, após inoculação da *A. hydrophila*, ocorre disseminação gradual e sistêmica em órgãos como: coração, baço, fígado, rim e encéfalo, tanto do microrganismo como exotoxinas, confirmada pela imunomarcagem com IgY-anti *A. hydrophila* policlonal nos órgãos.

Essas diferenças nos padrões de respostas inflamatória sistêmica e infecciosa em peixes podem ser atribuídas aos fatores supracitados e, também às diversas classes que constituem a infraclasse dos teleósteos, atualmente com mais de vinte e cinco mil espécies (CLEVELAND e HICKMAN, 2013).

Decorrente de sua função, de sua posição filogenética e de sua importância econômica, a utilização de peixes, como modelo experimental, traz contribuições relevantes para área da patologia comparada e no incremento da produção aquícola (BOZZO et al., 2007; CLAUDIANO et al., 2013; SALVADOR et al., 2013; CASTRO et al., 2014a, b, MANRIQUE et al., 2015).

Em suma ao exposto acima fica evidente as escassas as informações sobre a identificação e caracterização da participação neuroendócrina e imune na sepse, entre as diferentes espécies de teleósteos, particularmente em peixes tropicais. Torna-se, então, necessário produzir novas informações quanto à dinâmica do processo e aos diferentes fenômenos fisiopatológicos durante o desenvolvimento da sepse, sobre o perfil hematológico, bioquímico, hormonal, radicais livres e variáveis imunes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

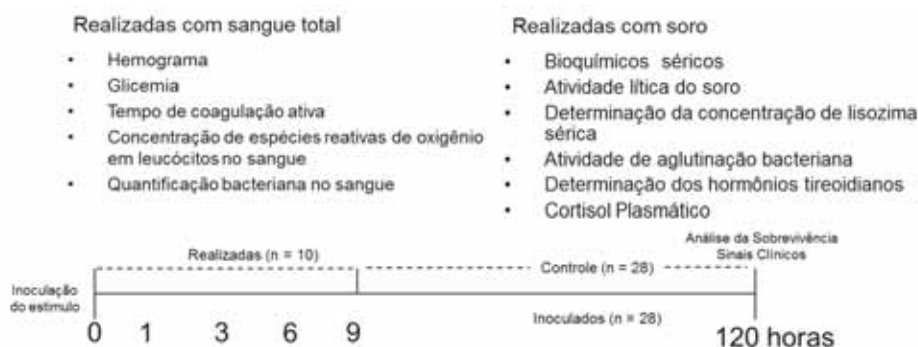
Estudar os aspectos fisiopatológicos durante a evolução da reposta séptica induzida por *Aeromonas hydrophila* em *Piaractus mesopotamicus* – pacus.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar o perfil clínico laboratorial de pacus com sepse induzida pela *A. hydrophila*;
2. Avaliar as concentrações séricas dos hormônios tireoidianos e do cortisol em pacus com sepse induzida por *A. hydrophila*;
3. Investigar resposta imune inata (concentração sérica de lisozima, atividade lítica do soro, surto oxidativo de leucócitos sanguíneos, concentração de anticorpos naturais) em pacus portadores de sepse induzida por *A. hydrophila*;
4. Avaliar os sinais clínicos e sobrevivência de pacus inoculados com *A. hydrophila* em concentração previamente estabelecida.

3. Material e Métodos

O material biológico foi coletado e analisado segundo o esquema experimental, exposto abaixo:



3.1 Peixes e delineamento experimental

O presente estudo foi desenvolvido entre os anos de 2013 a 2015, pelos Departamentos de Patologia Veterinária e de Tecnologia da FCAV – UNESP; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e pela Universidade Federal de Uberlândia. Foram adotadas as Normas de Apresentação de Trabalhos da Universidade Estadual de São Paulo (2000), normas para referências bibliográficas de títulos e periódicos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-6023) e dos Princípios Éticos na Experimentação Animal propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Aprovação do Comitê de Ética do projeto nº 008577/12).

Foram utilizados 162 pacus, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), com peso médio de $180,71 \pm 56,73$ g e comprimento total médio de $21,27 \pm 6,70$ cm, adquiridos de piscicultura comercial da mesma desova. Inicialmente, os peixes foram acondicionados em tanque escavado (3000 L), para quarentena, em seguida foram distribuídos, aleatoriamente, em caixas de fibra (250 L/ n=6), abastecidas com água corrente, de poço artesiano, com vazão de 1L/min. e com aeração suplementar. Os peixes receberam ração comercial peletizada (28% PB e 4000 kcal/kg⁻¹EB), pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa. As caixas foram sifonadas semanalmente, e a qualidade da água determinada diariamente com oxímetro YSI®, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pelo YSI®, modelo 63, mantendo-se

dentro da faixa de conforto para espécie (oxigênio dissolvido= 5,1 mg/L; temperatura = 29,47 °C; pH= 7,66 e a condutividade elétrica = 117,96 µS/cm) (BOYD, 1990; SIPAUBA-TAVARES e MORENO, 1994).

3.2 Obtenção da bactéria

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados, que apresentavam lesões compatíveis com aeromonose, proveniente de piscicultura comercial. Para tanto, os animais foram coletados e transportados até o laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Unesp, Jaboticabal (FCAV).

Após a chegada, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, Alemanha), 100 mg L⁻¹ (bem-estar animal e ISO - Organização Internacional para Padronização, 2006).

Durante a necropsia foram colhidos assepticamente fragmentos de encéfalo, rim, fígado e baço para cultura bacteriológica. Amostras colhidas destes fragmentos foram semeadas em placas de Petri, contendo TSA (Difco®), adicionado com ampicilina (10 mg/L), que foram incubadas por 24 h, a 30 °C em atmosfera de aerofilia. Após a incubação, as colônias suspeitas foram identificadas por suas características morfológicas e tintoriais, seguida de métodos bioquímicos e pelo “kit Bactray 3”. Estes exames revelaram tratar-se de *Aeromonas hydrophila*.

A caracterização genética ocorreu através da multiplicação da *Aeromonas hydrophila* em meio TSA, por 24 horas a 30°C em atmosfera de aerofilia. Após a multiplicação bacteriana, uma alçada de massa celular foi utilizada para extração do DNA utilizando o “Genomic DNA purification kit (Wizard®)”, segundo metodologia descrita pelo fabricante. Ao final, obteve-se a concentração de DNA de 1690,9 ng/µL, com relação 260/280 e 260/230 2,02 e 2,04, respectivamente. A amplificação do gene 16 S RNA ribossômico foi realizada de acordo com Sarkar et al. (2012). As sequências foram analisadas pelo algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a fim de determinar a espécie bacteriana. O limite fixado para determinação da espécie foi de 98% de similaridade na análise de BLAST, resultando na similaridade de 99% para *Aeromonas hydrophila*.

Após determinação da espécie bacteriana, foram realizadas quatro reativações subsequentes *in vivo*, utilizando-se dois pacus por passagem na dose de 1 mL/ $2,4 \times 10^9$ UFC por animal, correspondente ao tubo 8 da escala de McFarland, via cavidade celomática. Todos os animais inoculados vieram a óbito, em média, 12 HPI. Ao término da quarta passagem, foram realizados os isolamentos do encéfalo, rim e sangue de todos os peixes para confirmação microbiológico e genética.

Após a obtenção e confirmação das colônias puras, estas foram semeadas em TSB. Após 24 horas de incubação a 30°C, o material foi centrifugado a 1.200 g, a 4°C, por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. A massa bacteriana precipitada foi diluída em solução salina (0,65%) estéril até a obtenção das concentrações desejadas (item 3.3 e/ou 3.4), utilizando-se a escala de MacFarland.

3.3 Determinação da DL50% (DL (I) (50-96H)) para o inóculo bacteriano

Para a determinação da DL50%(DL (I) (50-96H)) usada como inóculo bacteriano, foram utilizados 48 pacus, *P. mesopotamicus*, distribuídos em seis caixas d'água de 250 L, com oito animais/cada, em delineamento inteiramente casualizado. Quarenta pacus foram submetidos à inoculação com 0,5 mL de concentrações crescentes de *A. hydrophila*, correspondentes aos tubos de 5 a 9 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^9$; $1,8 \times 10^9$; $2,1 \times 10^9$, $2,4 \times 10^9$, $2,7 \times 10^9$ células bacterianas por mL), na cavidade celomática. Os animais do grupo controle (n=8) receberam 0,5 mL de solução salina esterilizada (0.65%) pela mesma via. Durante o período de exposição (96h), os peixes foram mantidos sem alimentação e sem sifonagem da água, com monitoramento diário das variáveis físico-químicas e da taxa de mortalidade. Os valores da DL (I) 50-96h foram calculados pelo método "trimmed sperman Karber", obtendo a DL50 estimada em $1,78 \times 10^9$ e com o limite inferior e superior em $1,64 \times 10^9$ e $2,3 \times 10^9$, respectivamente.

3.4 Indução da sepse por *Aeromonas hydrophila* e coleta sangue

A sepse foi induzida pela inoculação celomática de 0,5 mL a $1,8 \times 10^9$ UFC/mL, por animal (correspondente DL50%). Todos os peixes foram submetidos à anestesia com benzocaína, diluída (1g/10mL) (WEDEMEYER, 1970) e mantidos nesta solução até atingir o plano cirúrgico da escala de Ross e Ross (2008). Atingido o plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito para a inoculação da solução bacteriana, com auxílio de agulha e seringa de tuberculina esterilizadas para atingir a cavidade celomática. Os animais foram divididos em dois grupos, em delineamento inteiramente casualizado, um deles recebeu 0,5 mL de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65% (grupo controle) e outro recebeu o mesmo volume dessa solução, contendo o inóculo bacteriano, constituindo-se no grupo desafio.

Nos tempos pré-determinados de 1, 3, 6 e 9 horas, após a indução da sepse, 10 animais de cada tempo mais o grupo controle foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento do plano anestésico, com solução de benzocaína (1:20.000), diluída em álcool 98° (0,1 g/mL) (WEDEMEYER, 1970).

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

3.5 Determinação da concentração sérica de hormônios

3.5.1 Determinação da concentração de cortisol sérico

As amostras de soro para determinação da concentração de cortisol foram avaliadas no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (FMRP/USP), sob a supervisão da Prof^a Margaret Castro. Para tanto, utilizou-se o método de radioimunoensaio, segundo Gazola et al. (1996), que consiste em ensaio de competição por quantidade fixa de hormônio marcado (100µL) + quantidade fixa de anticorpo anti-cortisol (Cortisol-3-(O-carboxymethyl)-oxime-BSA

(Thermo scientific®) (100 µL) + quantificação variável do soro dos animais (100 µL) + 500 µL tampão fosfato (0,05 M; pH 7,0), lida em contador de radiação Beta.

3.5.2 Determinação da concentração sérica dos hormônios tireoidianos

As quantificações das concentrações séricas dos hormônios da tireóide T₃ e T₄ foram realizadas no laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, na cidade de Uberlândia/MG, sob supervisão do Prof. Dr. Antonio V. Mundim, pelo princípio de imunensaio enzimático competitivo (ELISA), utilizando-se 50 µL de soro/amostra, pelo “kit Biolisa” T₃ e T₄ total da BIOCLIM®, respectivamente, conforme metodologia descrita pelo fabricante, inclusive a curva de calibração.

3.6 Variáveis clínicas laboratoriais

As amostras de sangue para determinações hematológicas e bioquímicas foram coletadas nos tempos supracitados (item 3.4), por punção do vaso caudal, com seringas e agulhas estéreis e encaminhadas para as seguintes análises:

3.6.1 Hemograma

Uma alíquota do sangue total foi destinada às análises hematológicas (hemograma – incluindo número de eritrócitos; taxa de hematócrito; taxa de hemoglobina; volume corpuscular médio/ VCM ($Ht \times 10/Ert$); hemoglobina corpuscular média/ HCM ($Hb \times 10/Ert$); concentração de hemoglobina corpuscular média/ CHCM ($Hb \times 100/Ht$) e contagem do número de leucócitos e trombócitos foram realizadas, utilizando-se os métodos de rotina do Laboratório de Ictiopatologia da FCAV, realizados pelo método direto, em câmara de Neubauer (TAVARES-DIAS et al., 1999).

Para a realização do hematócrito, utilizou-se a técnica de microhematócrito, em tubos capilares com uma das extremidades fechadas e centrifugada por cerca de 5 minutos, em 11000 rpm e comparados com o cartão de leitura para hematócrito. A hemoglobina foi aferida com o método Drabkin, com leitura em espectrofotômetro em frequência de 540 nanômetros.

Para o diferencial de leucócitos e trombócitos, as extensões sanguíneas foram confeccionadas e coradas de acordo com método descrito por Tavares-Dias e Moraes (2003). A identificação e nomenclatura dos leucócitos seguiram as recomendações de Tavares-Dias et al. (1999). Durante a contagem diferencial de leucócitos, também, foram avaliadas qualitativamente a presença de modificações eritrocitárias, leucocitárias e trombocitárias (HARVEY, 2012).

3.6.2 Perfil bioquímico sérico

Outra fração do sangue total foi destinada a obtenção do soro, por meio de centrifugação em 1200 g, a 4°C, e transferido em alíquotas para microtubos (Eppendorf), que foram armazenados a 80 °C negativos, até o momento das análises.

As análises das variáveis bioquímicas foram processadas em analisador automático, multicanal ChemWell®, usando “kits” comerciais (Labtest Diagnóstica®), no laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, na cidade de Uberlândia/MG, sob supervisão do Profº Dr. Antonio V. Mundim. O analisador foi previamente calibrado com Calibra H e aferido com soro controle universal, com o controle de valor conhecido Qualitrol H (Labtest Diagnóstica®). Foram determinadas nas amostras de soro as concentrações de proteína total (método do biureto), albumina (método verde de bromocresol), ácido úrico (método enzimático Trinder), uréia (método cinético enzimático UV), creatinina, (método do picrato alcalino), triglicérides (método enzimático Trinder), colesterol (método enzimático Trinder), HDL-C (método colorimétrico – acelerador detergente seletivo), cálcio (método CPC – cresoltaleína complexona), fósforo (método fosfomolibdato), relação cálcio/fósforo (calculada), CK (método cinético UV), GGT (método Szasz modificado), AST (método cinético UV-IFCC), ALT (método cinético UV-IFCC), lactato, ferro, LDH, globulina (cálculo subtraindo o valor de albumina de proteínas totais) e relação albumina/globulina (cálculo albumina/globulinas).

3.6.3 Glicemia

A determinação da glicemia foi realizada no momento da coleta de sangue total, utilizando-se analisador rápido para glicose “OneTouch Ultra Mini™” da Johnson and Johnson Medical®.

3.6.4 Tempo de coagulação ativa

O teste do tempo de coagulação ativa foi realizado logo após a coleta do sangue, por punção do vaso caudal, utilizando-se o método “Slide Method”. Este método consiste em, imediatamente, após a coleta de sangue (s/anticoagulante), adicionar uma gota sobre lâmina de vidro. Esta gota foi tocada por uma agulha (25x7) e puxada para verificar a formação de fio de sangue na sua ponta correspondente à formação de coágulo. A cronometragem foi iniciada quando a gota de sangue foi colocada na lâmina e a cada 15 segundos, até a formação do fio. Neste momento o cronômetro foi interrompido e anotado o tempo de formação do coágulo.

3.6.5 Quantificação bacteriana no sangue

A quantificação do número de bactérias no sangue foi realizada em todos os tempos de análises. Após a coleta do sangue total, 20 µL de sangue foram semeados, sem diluição, pelo método de espalhamento em placas de Petri, contendo meio TSA, adicionado com ampicilina (10 mg/L). Após a semeadura, as placas foram incubadas por 24 horas, a 30 °C em atmosfera de aerofilia. A seguir, as placas foram levadas ao contador de colônia para sua quantificação. Cada amostra foi semeada em duplicata e os resultados expressos como da UFC.

3.7 Avaliação da imunidade inata

3.7.1 Concentração das espécies reativas de oxigênio em leucócitos no sangue

O sangue total de todos os tempos de análise foi utilizado para avaliar o surto oxidativo de leucócitos do sangue dos peixes (ANDERSON e SIWICKI, 1995; CASTRO et al., 2014). Inicialmente, uma pastilha do corante “nitrobluetetrazolium” (NBT, Sigma, ST Luis, MO, USA) foi dissolvida em 5 mL

de PBS (1x ph 7,2). Em seguida, 100 μ L de sangue heparinizado foram adicionados em 100 μ L da solução de NBT mais 25 μ L de PMA 10-5 (Forbol-12-Miristato-13-Acetato, 99% - 1mg), esta mistura foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente (± 26 °C).

Após este período, 50 μ L da suspensão foram colocadas em tubo de ensaio com mais 1,0 mL de DMF (N, N- dimetilformamida - Sigma-Aldrich®) e agitado com auxílio de micropipeta. Em seguida, a solução foi centrifugada em 1500 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e a densidade óptica da solução determinada em espectrofotômetro (Unico 2100), no comprimento de onda de 540 nm.

3.7.2 Atividade lítica do soro

Para a padronização do crescimento da cepa bacteriana, um ensaio prévio foi realizado para determinação do fator de diluição correspondente para permitir a contagem de colônias entre 30 e 300 UFC/placa, necessário à confiabilidade das contagens. Para a padronização foram realizadas seis diluições de *A. hydrophila* em água peptona tamponada ($1,8 \times 10^9$ UFC inóculo original, 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000), seguidas, semeadas pelo método de espalhamento em placa de TSA, adicionado com ampicilina (10 mg/L) e incubadas por 24 horas, a 28 °C, com posterior contagem das colônias em contador automático.

Para o ensaio definitivo, foi estabelecida a diluição em 1:100.000 em água peptonada (pH 7,2) da cepa de *A. hydrophila*. As culturas de *A. hydrophila* (10^6 UFC) foram lavadas e preparadas, conforme descrito no item 3.2. Em seguida 50 μ L da suspensão de *A. hydrophila* foi acrescido a 50 μ L de soro das amostras em microtubos (Eppendorf/1,5 mL) e esta mistura foi incubada durante 1 h, a 28 °C. Após este procedimento, a suspensão resultante (100 μ L) foi semeada pelo método de espalhamento em placa com TSA, adicionado com ampicilina (10 mg/L) e incubadas por 24 horas, a 28 °C em atmosfera de aerofilia. Após o tempo de crescimento, foi realizada a contagem das colônias. Para controle da técnica (Grupo referência), foi utilizada uma suspensão de 50 μ L de solução de cloreto de sódio esterilizada a 0,65% e acrescido a 50 μ L da suspensão de *A. hydrophila* em microtubos. A

seguir, foram realizados os mesmos procedimentos, supra descritos. Os resultados foram expressos em UFC.

3.7.3 Determinação da concentração de lisozima sérica

A concentração de lisozima sérica foi determinada por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptada por Marzocchi Machado et al. (1999), Barbosa (2011) e Castro et al. (2014).

Uma curva padrão, utilizando-se lisozima liofilizada (1mg/mL^{-1}) de clara de ovo de galinha nas concentrações de 5, 10, 100, 200, 250 e 300 ng lisozima/300 μL , suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 ng/mL) em tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) foi preparada e lida em leitor de placa (SpectraMax M5 Microplate Reader®) em 450 nm. Os resultados são expressos como a diferença entre a densidade óptica inicial e final utilizados para quantificação das concentrações de lisozima nas amostras. O branco foi preparado utilizando-se somente o tampão fosfato (300 μL).

Para determinação da concentração da lisozima sérica, inicialmente, as amostras de soro foram inativadas, em banho-maria a 45°C , durante 30 minutos, visando a inativação das proteínas do sistema complemento.

As preparações consistiram de 50 μL de soro inativado e 100 μL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2), cuja solução foi levada ao leitor de placa (SpectraMax M5 Microplate Reader®) para incubação durante dois minutos a 26°C . Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (150 μL) foi adicionada a solução, obtendo-se um volume final de 300 μL e então foi avaliada a redução da densidade óptica (ΔDO) em 450 nm entre 0,0 e 10,0 minutos a 26°C .

A concentração da lisozima ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) correspondeu à redução da ΔDO para cada volume da amostra avaliada (BARBOSA, 2011).

3.7.4 Atividade de aglutinação bacteriana

Inicialmente, foi realizado um ensaio prévio para que se estabelecesse o ponto de equivalência na relação dose – resposta entre as quantidades de UFC e soro. Para tanto, foram feitas as diluições em série de 50 μL de soro de cinco pacus, volume igual de PBS (pH 7,2) em cada poço, para adição de 50 μL nas diluições pré-estabelecidas de $3,0 \times 10^8$; $6,0 \times 10^8$; $9,0 \times 10^8$; $1,2 \times 10^9$; $1,5 \times$

10^9 ; $1,8 \times 10^9$; $2,1 \times 10^9$; $2,4 \times 10^9$; $2,7 \times 10^9$; $3,0 \times 10^9$ UFC de *A. hydrophila*. A dose ideal de resposta foi estabelecida como $1,8 \times 10^9$ UFC.

A atividade de aglutinação bacteriana natural do soro das amostras de todos os grupos foi realizada em placas de microtitulação com fundo em U. Foram feitas duas diluições em série de 50 μ L de soro dos peixes, com volume igual de PBS (pH 7,2) em cada poço, para adição de 50 μ L da *A. hydrophila* (10^6 UFC), inativada em banho-maria, a 60°C, por 40 min. As placas foram incubadas por 1 h, a 30 °C, e, em seguida, deixadas *over night*, em 4°C. O título foi calculado como o recíproco da diluição mais elevada de soro, mostrando-se aglutinação completa das células bacterianas, por meio de leitura visual das placas comparada ao padrão de sedimentação do poço de controle sem soro, com os padrões de sedimentação dos demais. O título de anticorpos totais foi identificado como a maior diluição em que se pôde observar a aglutinação positiva das bactérias. Os resultados foram expressos no log 2 dos recíprocos dos títulos dos soros (FERNANDES et al., 2015).

3.8 Avaliação dos sinais clínicos e análise da sobrevivência

Para avaliação dos sinais clínicos e sobrevida foram utilizados 56 pacus, divididos em dois grupos (n=28), um dos grupos inoculado com 0,5 mL de suspensão de *A. hydrophila* ($1,8 \times 10^9$ UFC), e o outro injetado com 0,5 mL de solução salina (0,65%) - controle. A determinação foi feita pela observação da sobrevivência dos animais durante o período de infecção, ou seja, após a indução da sepse. Foi estabelecido o prazo máximo de observação de cinco (5) dias.

3.9 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos às análises de variância em delineamento inteiramente casualizado (DIC), e feito o teste de normalidade alfa 5% (Kolmogorov – Smirnov; Anderson-Darling; Shapiro-Wilk e Watson). Estabelecida a normalidade dos dados foi realizada comparação das médias obtidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ou teste Dunn's (5%). O programa estatístico experimental utilizado foi “software R”. Os dados de sobrevivência foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, California, EUA).

4. Resultados

4.1 Concentração sérica de hormônios

4.1.1 Concentração de cortisol sérico

A Figura 1 mostra que pacus submetidos à sepse grave apresentaram aumento gradativo da concentração sérica de cortisol em todos os momentos após indução, com máxima concentração 3 HPI, seguido de diminuição significativa ($p < 0,05$) 9 HPI.

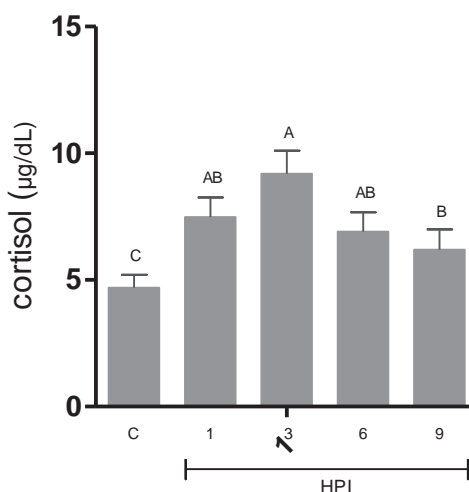


Figura 1 – **Concentração sérica de cortisol em pacus.** As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 10$). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). HPI – horas após inoculação; C – grupo controle.

4.1.2 Concentração dos hormônios tireoidianos

O hormônio tireoidiano T_3 apresentou decréscimo gradativo e contínuo das concentrações séricas dos animais sépticos, se comparados ao observado no grupo controle (Figura 2). Verificou-se que quanto maior o tempo de observação, mais significativa foi a diminuição (9 HPI; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao grupo avaliado 1 HPI. O grupo controle apresentou concentrações maiores ($p < 0,05$) do que o observado nos tempos 3, 6 e 9 HPI.

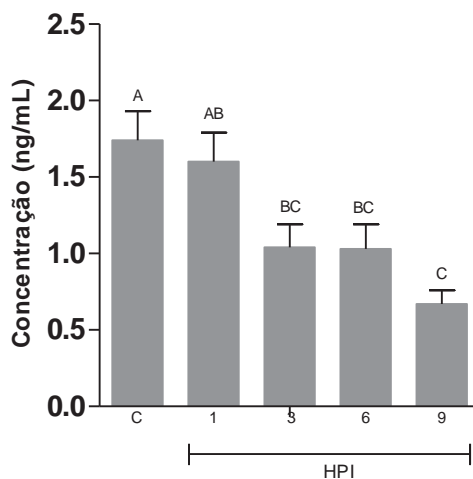


Figura 2 – **Concentração sérica de T₃**. As colunas verticais representam as médias de cada grupo, nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). HPI – horas após inoculação; C – grupo controle.

As concentrações séricas de T₄ dos pacus inoculados com *A. hydrophila*, estão representadas na Figura 3. Os resultados demonstram redução ($p > 0,05$) da concentração até 3 HPI nos peixes inoculados, seguido de aumento ($p > 0,05$) após 6 e 9 horas da indução da sepse.

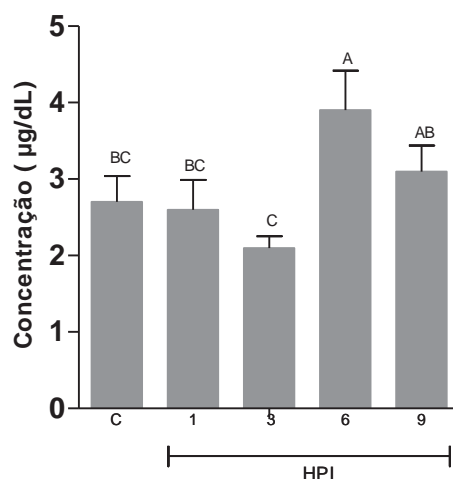


Figura 3 – **Concentração sérica de T₄**. As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). HPI – horas após inoculação; C – grupo controle.

4.2. Variáveis clínicas laboratoriais

4.2.1 Hemograma

As alterações causadas no hemograma pela indução da sepse nos pacus podem ser observadas na Tabela 1. Na análise do eritrograma verifica-se que com 9 HPI ocorreu aumento ($p < 0,05$) do VG em relação ao grupo controle e nos dois primeiros momentos da infecção. Não houve diferença ($p > 0,05$) na quantidade de eritrócitos, concentração de hemoglobina e nos índices hematimétricos entre os diferentes tempos de infecção e o grupo controle.

Da análise do leucograma pode-se verificar que a inoculação de *A. hydrophila* ativa em pacus induziu redução significativa ($p < 0,05$) dos leucócitos em todos os tempos analisados, se comparada ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1
Valores médios ¹(respectivos desvio padrão) e análise de variância para hemograma em *P. mesopotamicus* desafiados com *A. hydrophila*

| Variáveis | Grupos | | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Controle | 1 HPI | 3 HPI | 6 HPI | 9 HPI |
| VG (%) | 34.5 ± 3.6 B | 34.3 ± 1.7 B | 34.1 ± 2.7 B | 36.1 ± 1.5 AB | 38.6 ± 2.8 A |
| Hb (g/dl) | 10.5 ± 1.2 A | 10.6 ± 0.9 A | 10.2 ± 1.3 A | 10.2 ± 1.5 A | 11.4 ± 2.1 A |
| Ert($\times 10^6/\text{mm}^3$) | 1.5 ± 0.1 A | 1.4 ± 0.2 A | 1.5 ± 0.2 A | 1.3 ± 0.3 A | 1.5 ± 0.2 A |
| VCM (μm^3) | 214.3 ± 28.8 A | 234.1 ± 43.3 A | 243.8 ± 31.3 A | 239.3 ± 39.1 A | 250.5 ± 28.2 A |
| HCM (pg) | 65.4 ± 9.3 A | 73.1 ± 16.1 A | 73.7 ± 13.3 A | 67.7 ± 14.5 A | 73.8 ± 13.7 A |
| CHCM (%) | 31.3 ± 5.9 A | 31.1 ± 2.9 A | 30.1 ± 2.4 A | 28.3 ± 4.1 A | 29.5 ± 4.7 A |
| Leucócitos Totais ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) | 7.8 ± 2.9 A | 4.8 ± 1.6 B | 3.2 ± 1.1 B | 4.5 ± 2.2 B | 4.5 ± 2.3 B |
| Linfócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) | 1.7 ± 0.8 A | 0.6 ± 0.4 B | 0.8 ± 0.4 B | 1.4 ± 0.5 A | 1.1 ± 0.9 A |
| Monócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) | 1.3 ± 0.7 A | 0.4 ± 0.3 B | 0.6 ± 0.4 A | 0.7 ± 0.4 A | 0.8 ± 0.3 A |
| Granulócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) | 1.2 ± 0.7 A | 0.6 ± 0.4 B | 0.8 ± 0.6 B | 1.8 ± 1.5 A | 1.4 ± 1.2 A |
| Trombócitos ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) | 3.4 ± 2.1 A | 3.1 ± 1.4 A | 0.9 ± 0.7 B | 0.8 ± 0.7 B | 1.1 ± 0.7 B |

¹ Médias (n=15) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). ² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes grupos.

VG - Hematócrito; Hb - hemoglobina; Ert - eritrócitos; VCM - Volume Corpuscular Médio; CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média; HPI horas após indução; Granulócitos - constituídos de neutrófilos e célula granulocítica especial

Ao exame das extensões sanguíneas foram observados linfócitos, monócitos, granulócitos (neutrófilos e célula granulocítica especial), trombócitos e eosinófilos (Figura 4). No entanto, os eosinófilos não foram contabilizados, pois foram encontrados apenas em 4 animais de grupos variados. Em todas as extensões analisadas não foram encontrados basófilos.

Ainda na análise da Tabela 1 verifica-se diminuição do número dos linfócitos nos tempos de 1 e 3 HPI em relação ao grupo controle e nos tempos de 6 e 9 HPI ($p < 0,05$), o mesmo perfil de resposta foi identificado na contagem de granulócitos. Observou-se redução dos números de monócitos com 1 HPI, sendo estatisticamente inferior ($p < 0,05$) a todos os grupos. Verificou-se redução do número de trombócitos ($p < 0,05$) induzida pela infecção após 3 HPI (Tabela 1).

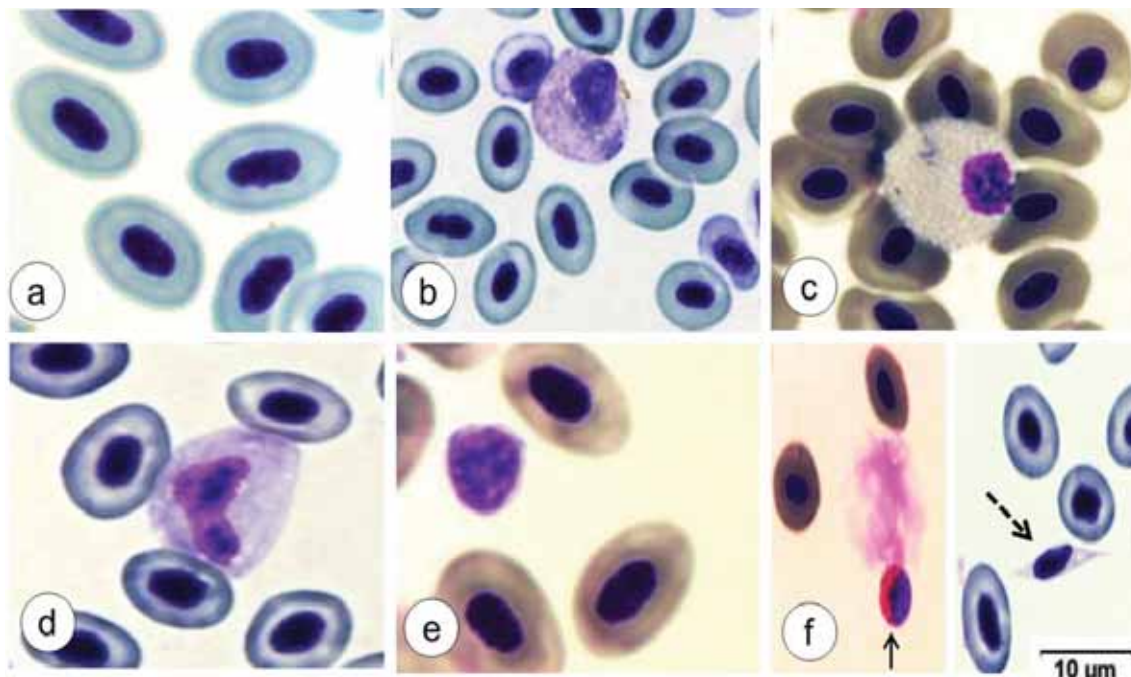


Figura 4 – Células sanguíneas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Eritrócitos (a); neutrófilo (b); Célula granulocítica especial (c); monócito (d); linfócito (e); eosinófilo (f – seta) e trombócito (f – ponta das setas pontilhada). Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra= 10 μ m

A Figura 5 mostra a presença de modificações eritrocitárias, trombocitárias e leucocitárias nas extensões sanguíneas dos peixes inoculados com *A. hydrophila*. As alterações mais comuns encontradas em eritrócitos foram anisocitose, poiquilocitose, hipocromia e binucleose. Foram identificadas quantidades significativas de células imaturas, apresentando policromasia, poiquilocitose e intensa basofilia citoplasmática. Os trombócitos apresentaram grandes diferenciações no tamanho e forma, alguns binucleados.

A análise dos leucócitos identificou, de maneira geral, pleomorfismo com intensa vacuolização citoplasmática de diferentes tamanhos e atividade fagocitária em monócitos e granulócitos. A vacuolização foi mais intensa em monócitos, observando-se graves alterações tóxicas em monócitos e granulócitos. Linfócitos também apresentaram intensa basofilia citoplasmática e vacuolização (Figura 5).

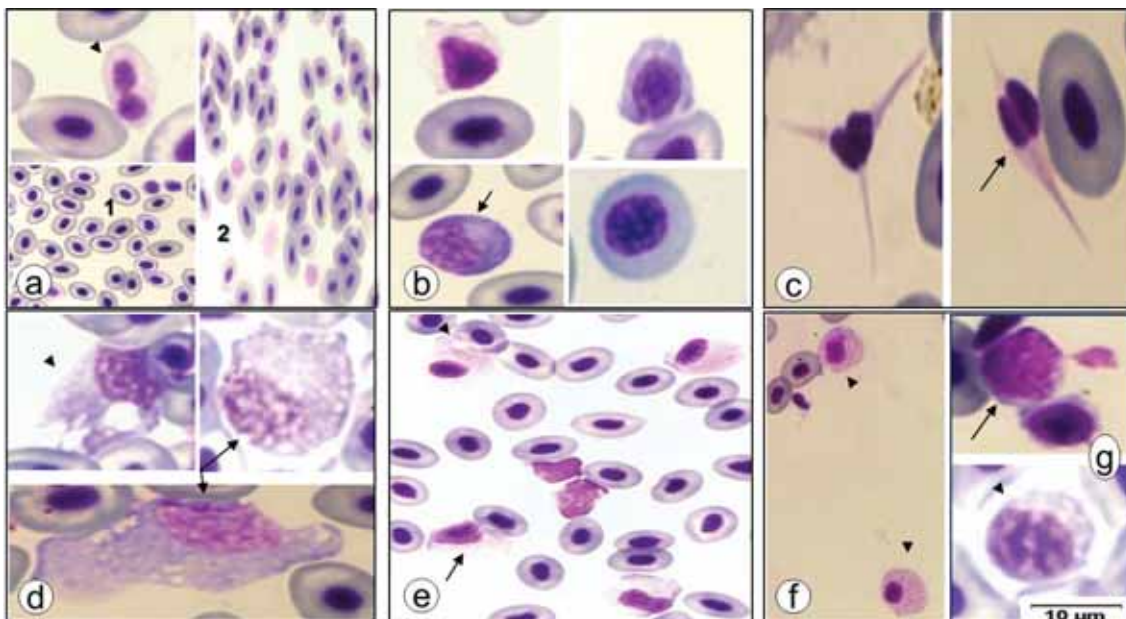


Figura 5 – **Anomalias morfológicas de células sanguíneas de pacus inoculados com *Aeromonas hydrophila*.**(a)Eritrócito binucleado (ponta seta), hipocromia (1) e anisocitose (2); (b) células imaturas com poiquilocitose e intensa basofilia (seta); (c)Trombócitos com alteração forma e binucleação (seta); (d) monócito com diferentes graus de vacuolização (seta) e com graves alterações tóxicas (ponta de seta); (e) granulócitos com diferentes formas, vacuolização leve (ponta seta) e alterações tóxicas (seta);(f) atividade fagocitária em granulócitos (ponta seta); (g) linfócitos intensa basofilia citoplasmática (seta) e vacuolização (ponta seta). Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra= 10 µm

4.2.2 Perfil bioquímico sérico

Os valores bioquímicos séricos em *P. mesopotamicus* inoculados com bactéria estão apresentadas na Tabela 2. Durante a evolução do processo não se verificou diferença ($p>0,05$) na concentração das proteínas sanguíneas analisadas entre os grupos sépticos e o controle.

Ao exame dos metabólitos sanguíneos verificou-se diminuição ($p<0,05$; tab. 2) na concentração de ácido úrico 6 e 9 HPI em relação ao grupo controle; a concentração de colesterol e o HDL apresentaram redução significativa 9 HPI ($p<0,05$); na de lactato sanguíneo verificou-se aumento ($p<0,05$) 1 HPI em relação aos outros grupos; a concentração de triglicerídeos apresentou maior concentração 1 HPI diferindo ($p<0,05$) dos outros momentos de infecção, sendo o valor 9 HPI menor que o do grupo controle ($p<0,05$). Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os animais inoculados e o controle em relação à creatinina e uréia (Tabela 2).

Tabela 2

Valores médios¹ (respetivos erro padrão) e análise de variância para valores séricos do sangue - pacus normais e inoculados com *A. hydrophila* em diferentes tempos

| Parâmetros | Grupos (horas após indução) | | | | | | | | | | |
|-------------|-----------------------------|------------------|-------|-----------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|-----------------|---|
| | Controle | | 1 HPI | | 3 HPI | | 6 HPI | | 9 HPI | | |
| Proteínas | PPT (g/dL) | 3.7 ± 0.2 | A | 3.8 ± 0.1 | A | 3.3 ± 0.1 | A | 3.4 ± 0.2 | A | 3.5 ± 0.09 | A |
| | Albumina (g/dL) | 1.09 ± 0.03 | A | 0.9 ± 0.03 | A | 1.01 ± 0.03 | A | 1.02 ± 0.03 | A | 1.05 ± 0.02 | A |
| | Globulina (g/dL) | 2.6 ± 0.2 | A | 2.8 ± 0.07 | A | 2.4 ± 0.08 | A | 2.6 ± 0.1 | A | 2.5 ± 0.08 | A |
| | Relação A:G | 0.41 ± 0.03 | A | 0.35 ± 0.01 | A | 0.41 ± 0.02 | A | 0.4 ± 0.03 | A | 0.41 ± 0.01 | A |
| Metabólitos | Ácido Úrico (mg/dL) | 0.74 ± 0.07 | A | 0.64 ± 0.06 | AB | 0.61 ± 0.04 | AB | 0.44 ± 0.08 | B | 0.45 ± 0.07 | B |
| | Creatinina (mg/dL) | 0.25 ± 0.02 | A | 0.24 ± 0.02 | A | 0.27 ± 0.03 | A | 0.20 ± 0.01 | A | 0.24 ± 0.01 | A |
| | Uréia (mg/dL) | 11.1 ± 1.2 | A | 9.09 ± 1.1 | A | 9.3 ± 1.3 | A | 7.6 ± 0.7 | A | 8.3 ± 0.8 | A |
| | Colesterol Total (mg/dL) | 133.7 ± 6.2 | A | 118.4 ± 9.4 | AB | 122.1 ± 8.5 | AB | 143.3 ± 7.2 | A | 108.2 ± 7.4 | B |
| | HDL-LE (mg/dL) | 22.4 ± 1.5 | A | 20.7 ± 2.1 | A | 22.2 ± 2.09 | A | 21.6 ± 1.6 | A | 16.5 ± 1.5 | B |
| | Lactato (mg/dL) | 47.8 ± 1.6 | B | 58.3 ± 3.1 | A | 45.4 ± 1.9 | B | 44.8 ± 1.6 | B | 41.3 ± 2.2 | B |
| | Triglicérides (mg/dL) | 176.3 ± 12.7 | B | 218.8 ± 8.3 | A | 164.4 ± 8.8 | BC | 148.6 ± 9.2 | BC | 126.5 ± 9.3 | C |
| | Cálcio (mg/dL) | 13.1 ± 0.5 | A | 14.6 ± 0.2 | A | 11.8 ± 0.5 | B | 12.3 ± 0.2 | B | 11.3 ± 0.3 | B |
| Eletrólitos | Fósforo (mg/dL) | 12.2 ± 0.7 | A | 11.1 ± 0.5 | A | 10.6 ± 0.6 | A | 10.9 ± 0.6 | A | 12.6 ± 0.9 | A |
| | Relação Ca:P | 1.1 ± 0.05 | A | 1.4 ± 0.1 | A | 1.2 ± 0.1 | AB | 1.1 ± 0.1 | AB | 0.9 ± 0.07 | B |
| | Ferro (mg/dL) | 82.5 ± 5.4 | A | 85.7 ± 6.3 | A | 62.7 ± 8.5 | B | 52.7 ± 8.4 | B | 63.1 ± 7.2 | B |
| | Magnésio (mg/dL) | 3.7 ± 0.1 | A | 3.8 ± 0.1 | A | 3.6 ± 0.2 | A | 3.4 ± 0.08 | A | 3.5 ± 0.1 | A |
| Enzimas | AST (U/L) | 108.1 ± 12.3 | B | 78.2 ± 8.8 | B | 154.6 ± 28.8 | B | 119.5 ± 13.1 | B | 216.8 ± 32.9 | A |
| | ALT (U/L) | 9.4 ± 1.1 | B | 13.8 ± 1.1 | A | 12.2 ± 1.2 | AB | 15.4 ± 3.6 | AB | 13.6 ± 1.7 | A |
| | Fosfatase Alcalina (U/L) | 35.8 ± 3.9 | A | 46.1 ± 4.3 | A | 48.3 ± 9.2 | A | 38.8 ± 7.1 | A | 47.8 ± 6.6 | A |
| | GGT (U/L) | 12.4 ± 1.7 | A | 8.9 ± 1.1 | A | 12.8 ± 2.2 | A | 7.3 ± 0.7 | A | 10.6 ± 2.1 | A |
| | CK (U/L) | 14889.1 ± 3745.6 | A | 7078.6 ± 1790.2 | A | 11489.1 ± 3540.2 | A | 10451.2 ± 2163.6 | A | 6126.9 ± 2488.4 | A |
| | LDH (U/L) | 3214.8 ± 560.4 | A | 4791.9 ± 910.4 | A | 3496.1 ± 480.1 | A | 3480.1 ± 394.6 | A | 3838.9 ± 551.1 | A |

¹ Médias (n=15) seguidas de pelo menos por uma letra em comum não diferiram pelo teste de Tukey (P>0,05); exceto ALT e CK pelo teste Dunn's (P>0,05). ² Letras maiúsculas comparam na coluna os diferentes grupos. HPI - horas após indução. Aspartato aminotransferase (AST); Alanina aminotransferase (ALT); Creatina Fosfoquinase (CK); Lactato Desidrogenase (LDH); PPT - Proteínas GGT - γ -Glutamilttransferase; HDL - Lipoproteína de alta densidade

Pela análise da Tabela 2 verifica-se que não houve diferenças ($p>0,05$) em relação aos eletrólitos fósforo e magnésio entre os grupos e tempos de avaliação. O cálcio plasmático apresentou menor ($p<0,05$) concentração nos três últimos tempos de análise e a relação Ca:P apresentou menor concentração 9 HPI. O ferro sérico apresentou menores concentrações após 3 HPI se manteve até 9 HPI, diferindo estatisticamente de 1 HPI e dos animais injetados com solução salina 0.65% (Tabela 2).

A liberação de AST para a corrente sanguínea foi estatisticamente maior que 9 HPI, quando comparada aos outros grupos analisados; a enzima ALT apresentou maior concentração 1 e 9 HPI ($p<0,05$) em relação ao grupo controle. As variáveis FA, GGT, CK e LDH não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos estudados.

4.2.3 Glicemia

Na Figura 6 verifica-se que os peixes inoculados com *A. hydrophila* apresentaram rápida elevação da glicemia (1 HPI; $p<0,05$) seguido de consumo nos tempos 6 e 9 HPI que apresentaram menores índices glicêmicos ($p<0,05$) em relação aos outros grupos.

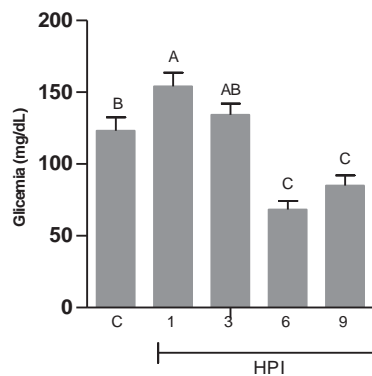


Figura 6 – **Glicemia**. As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 10$). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). HPI – horas após inoculação; C – grupo controle.

4.2.4 Tempo de coagulação ativa

Pela análise da Figura 7 não se verificam diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos estudados em relação ao tempo de coagulação ativa.

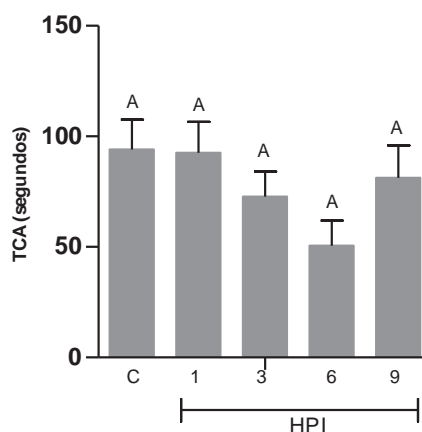


Figura 7 – **Teste de coagulação ativa**. As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 10$). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). HPI – horas após inoculação; C – grupo controle; TCA – tempo de coagulação ativa.

4.2.5 Quantificação bacteriana no sangue

O modelo de administração em cavidade celomática da bactéria permitiu a disseminação bacteriana pela corrente sanguínea dos animais inoculados, conforme apresentado na Figura 8, que expressa as unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas das amostras do sangue dos diferentes grupos experimentais. As UFC nos tempos de 6 e 9 HPI foram significativamente maiores ($p < 0,001$) comparados aos outros tempos de análise e ao controle.

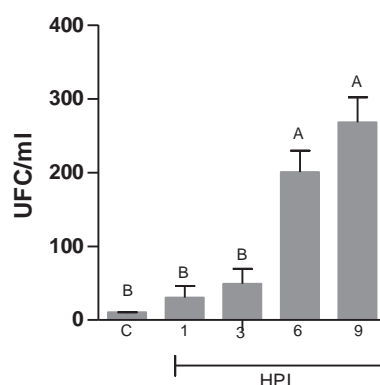


Figura 8 – **Quantificação bacteriana no sangue.** As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 10$). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Dunn (5%). HPI – horas após inoculação; C – grupo controle; UFC – unidade formadora de colônias.

4.3 Avaliação da Imunidade Inata

4.3.1 Concentração das espécies reativas de oxigênio

A Figura 9 mostra as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) observadas durante processo séptico em pacus inoculados com *A. hydrophila*. Verificou-se que os leucócitos apresentaram maior ($p < 0,05$) concentração de EROS 3 HPI, diferindo do grupo controle e do tempo de 6 HPI. Neste último tempo, ocorreu menor produção ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

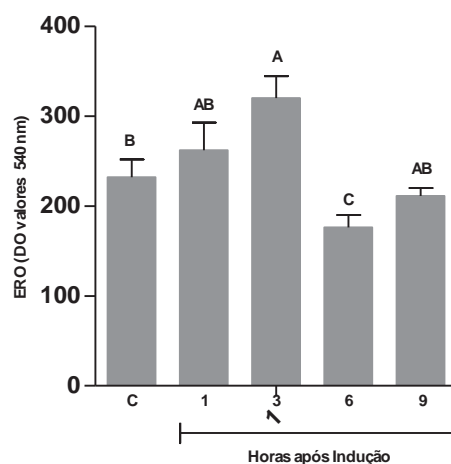


Figura 9 – **Concentração de espécies reativas de oxigênio em leucócitos sanguíneos.** As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). HPI – horas após inoculação; EROs – espécie reativas de oxigênio; C – grupo controle.

4.3.2 Atividade lítica do soro

A atividade lítica das proteases do soro dos peixes apresentou maior capacidade lítica sobre as colônias bacterianas com 6 e 9 HPI, diferindo estatisticamente do grupo referência e do grupo 1 HPI, conforme apresentado na Figura 10.

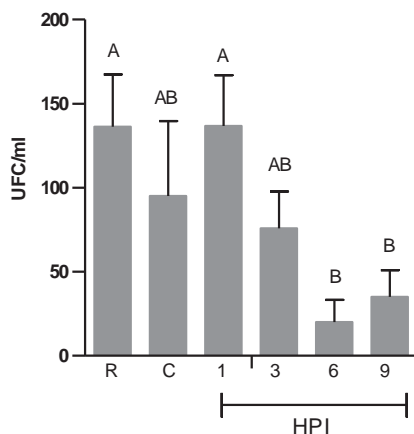


Figura 10 – **Atividade lítica do soro**. Número médio de UFC/mL de soro representado nas colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 10$). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Dunn (5%). HPI – horas após inoculação; UFC – unidade formadora de colônias; Grupo referência – solução salina (0,65%) + *A. hydrophila* (R); Controle – soro dos animais controle + *A. hydrophila* (C).

4.3.3 Concentração de lisozima sérica

A Figura 11 apresenta a curva de calibração utilizada para calcular a determinação da concentração de lisozima sérica das amostras do soro dos pacus inoculados com *A. hydrophila*, durante o período experimental. Verifica-se pela análise da Figura B que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos estudados.

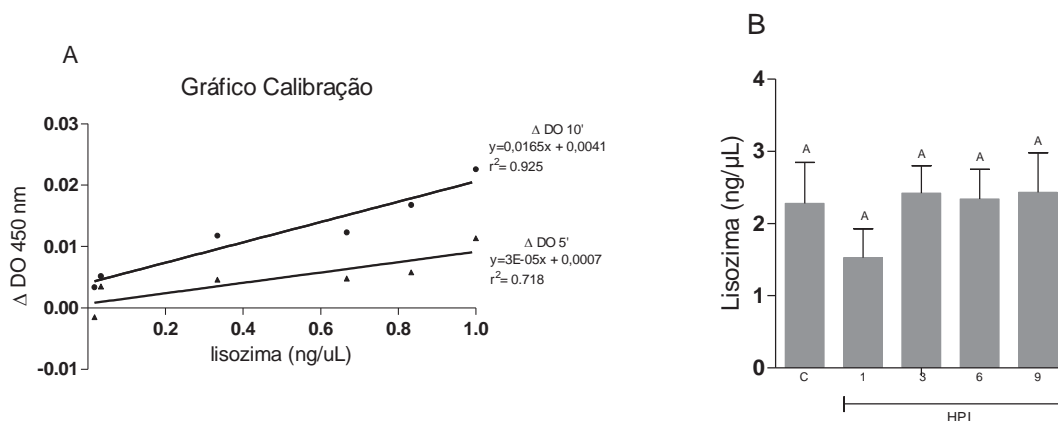


Figura 11 – **Curva de calibração para determinação da concentração de lisozima sérica e sua quantificação.** As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). ΔDO – corresponde a diferença entre a densidade inicial e a final; r^2 - coeficiente de determinação; HPI – horas após inoculação. C – grupo controle.

4.3.4 Atividade de aglutinação bacteriana

A Figura 12 expressa a capacidade de aglutinação dos anticorpos dos pacus contra *A. hydrophila* e demonstra que houve aumento ($p < 0,05$) dos títulos séricos depois de 3 HPI em relação ao grupo controle.

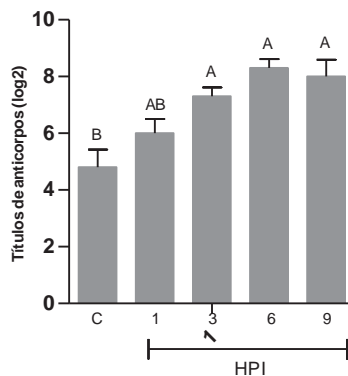


Figura 12 – **Valores dos títulos de anticorpos naturais.** As colunas verticais representam as médias de cada grupo nos diferentes tempos de avaliação. As barras verticais representam o erro padrão da média ($n = 10$). Colunas com letras em comum não diferem entre si pelo teste Tukey (5%). HPI, horas após inoculação. C – grupo controle.

4.4 Avaliação dos sinais clínicos e sobrevida

A partir de 9 HPI os peixes submetidos à infecção apresentaram petéquias e sufusões na superfície dorsal do corpo próximos ao local da inoculação. Após 24 HPI, os animais começaram a apresentar sinais clínicos sistêmicos característicos de aeromonose, tais como hemorragias cutâneas e nas nadadeiras; corrosão das nadadeiras, ulcerações cutâneas e letargia. Outros que vieram a óbito, antes deste período não manifestaram sinais clínicos (Figura 13).

Ainda na análise da Figura 13, observa-se que o grupo controle mostrou sobrevida de 100 % durante o período de observação (5 dias). O grupo inoculado apresentou diminuição da sobrevida para 85,71% durante as primeiras 12 horas, após indução séptica, e para 71,42 % e 57,14 % depois de 24 e 36 horas da inoculação, respectivamente, permanecendo até o final do período de observação.

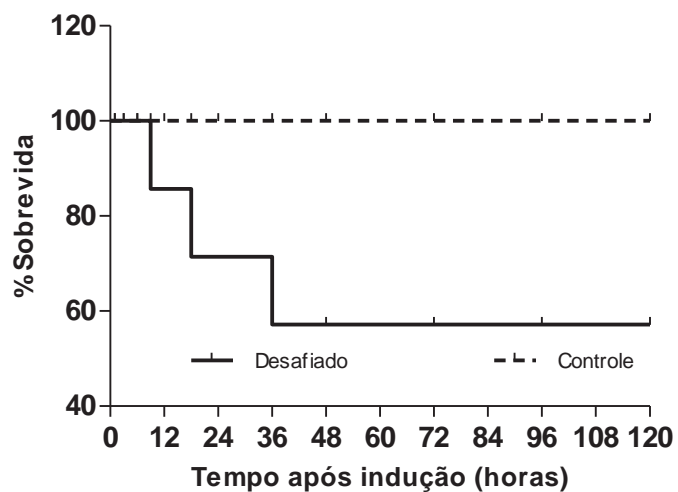


Figura 13 – **Sobrevida após indução da sepse grave.** Curva de sobrevivência em *P. mesopotamicus* (N = 28) inoculados com *Aeromonas hydrophila*.

4. Discussão

No presente estudo a inoculação de *A. hydrophila* na cavidade celomática induziu a sepse, evidenciada pelas alterações clínicas e imun-endócrinas, além de achados laboratoriais inespecíficos e de diminuição da sobrevivência. Estes achados são compatíveis com o descrito por Siqueira-Batista et al. (2011) em diferentes espécies animais.

Após o início da sepse ocorreram alterações sistêmicas, provavelmente decorrentes do rápido aumento da concentração de cortisol sérico ($p < 0,05$), em resposta ao estresse bacteriano. Este estimula o sistema simpático (HART et al., 1989) e a liberação de mediadores pró-inflamatórios que ativam o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal e induzem a liberação de cortisol (NARDOCCI et al., 2014).

A liberação do cortisol na sepse visa restabelecer a homeostase ameaçada por microrganismos invasores, pelo redirecionamento de energia aos órgãos vitais (MIZOCK, 2001). Neste estudo, foi evidenciado o imediato aumento da concentração de cortisol plasmático, que por sua vez, gerou o rápido aumento da glicemia (1 HPI; $p < 0,05$), provavelmente pela glicólise hepática, liberação e ação de glucagon e catecolaminas. Estes fenômenos causam a inibição da absorção de glicose por indução de resistência periférica à insulina (PILKIS e GRANNER, 1992), via gene não dependente pela ativação da adenil ciclase em mamíferos (GUYTON e HALL, 2011). Neste ensaio realizado com pacus os fenômenos parecem similares aos observados em mamíferos.

A hiperglicemia imediata e transitória seguida de hipoglicemia observadas no presente estudo corroboram o observado na sepse em cães (BOLLER e OTTO, 2009), gatos (PARSON et al., 2009), crustáceos (LORENZON et al., 1997) e pacientes humanos (BRANCO et al., 2007). Harikrishnan et al. (2003) observaram carpas hipoglicêmicas por 10 dias após a inoculação com *A. hydrophila*. Por outro lado, em trutas injetadas com LPS não foram observadas diferenças na glicemia 24 e 72 horas após a inoculação (MAGNONI et al., 2015). As diferenças podem ser atribuídas ao tempo de coleta, a espécie de peixe, dose infectante, anestésico empregado e ao tipo e modelo experimental empregado que foram diferentes.

As glândulas adrenais de mamíferos e as inter-renais de peixes associadas à tireóide desempenham importantes funções nesse mecanismo de adaptação (INGRAHAM et al., 1979; WEBSTER et al., 1991). Segundo McDonald (1980) animais bem adaptados respondem rapidamente às mudanças ambientais, proporcionando os ajustes fisiológicos necessários.

O estresse causado pela sepse induz disfunção nos sistemas biológicos dependente da integridade da resposta neuroendócrina. A participação dos hormônios tireoidianos neste quadro ainda é pouco esclarecida e controversa em pacientes humanos (RAY et al., 2006; BAYRAK et al., 2011).

Após a inoculação de *A. hydrophila* em pacus observou-se declínio progressivo de T_3 durante o processo, que pode ser atribuído ao seu consumo pelas células, decorrente do aumento da atividade metabólica sistêmica como ocorre em mamíferos (GUYTON e HALL, 2011) e/ou inibição da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide pela diminuição do TSH, descrito em pacientes com sepse (VAN DEN BERGHE et al., 1998; BIANCO et al., 2002).

Da análise da concentração de tiroxina plasmática observou-se redução ($p < 0,05$) 3 HPI, seguido de um pico ($p < 0,05$) 6 HPI e novo declínio. Esta resposta bifásica em pacus pode ser consequência das mesmas alterações descritas para T_3 . O pico do T_4 , neste caso, pode ser consequência da estimulação da glândula pituitária por citocinas pró-inflamatórias como observado por outros autores (PEKARY et al., 1994; RAY e MELMED, 1997). Outra hipótese sugere que seja decorrente de trocas entre os compartimentos plasmático e tecidual, como verificado para T_3 , T_4 e ambos também em pacientes humanos (PEETERS et al., 2005).

A redução da concentração plasmática de T_3 e T_4 pode ser benéfica para induzir diminuição da taxa metabólica e proteção contra hipercatabolismo. Ou, por outro lado, pode ser prejudicial devido à redução da produção de energia e contribuir para o agravamento da doença. Todavia, estas afirmações são inconclusivas, devido a resultados contraditórios encontrados na literatura (DOCTER et al., 1993; DE GROOT, 1999; PEETERS et al., 2005; BAYRAK et al., 2011). Indiferentemente destas controvérsias, neste ensaio, pacus infectados com *A. hydrophila*

apresentaram resultados que sugerem haver correlação entre a diminuição da concentração de T_3 e prognóstico desfavorável, visto a alta taxa de mortalidade encontrada.

Durante a evolução da sepse em pacus ocorreu decréscimo da cortisolemia, estabelecendo os mesmos níveis observados no grupo controle no 9 HPI ($p < 0,05$). Concomitante a isso, verificou-se redução ($p < 0,05$) da glicemia 6 e 9 HPI. Esta hipoglicemia pode ser atribuída à diminuição da resistência periférica à insulina e ao aumento da liberação da tiroxina, que causa rápida captação da glicose pelas células, decorrente da estimulação da glicólise e da gliconeogênese e pelo efeito secundário do aumento da secreção da insulina, como descrito em mamíferos (GUYTON e HALL, 2011).

No início o aumento da demanda energética pela resistência periférica à insulina causa desvio do sistema metabólico, de modo que a utilização da glicose é substituída pela de ácidos graxos, já mobilizados dos tecidos adiposos e da ativação da lipólise hepática em mamíferos (ORTH e BOLD, 1992). Estes fatos explicam o aumento no consumo ($p < 0,05$) dos substratos lipídicos, como colesterol total, HDL e triglicerídeos, verificados nos peixes infectados 9 HPI. Esta diminuição do colesterol total também foi observada em carpas, *Cyprinus carpio*, desafiadas com *A. hydrophila* (HARIKRISHNAN et al., 2003). Ratos tratados com glicocorticoide apresentaram aumento da quantidade de lipídeos hepáticos, fato atribuído à resistência à insulina causada pelo cortisol exógeno (SANTOS et al., 2007).

O catabolismo protéico é disfunção comum na sepse de humanos (BORGES, 1996). Neste estudo, observou-se diminuição do ácido úrico 9 HPI ($p < 0,05$), sendo possível atribuir este perfil à remodelação energética causada pelo cortisol, que não mobiliza as proteínas funcionais básicas das células, até a completa utilização de outros aminoácidos lábeis para síntese de substâncias essenciais ao organismo (GUYTON e HALL, 2011).

O estresse séptico gera aumento do metabolismo basal das células pela ativação do sistema simpático, descarga de catecolaminas e de cortisol, gerando aumento da demanda energética (GUYTON e HALL, 2011). Estas alterações, somadas à resistência periférica à insulina, fazem com que as células utilizem como fonte de energia a via da glicólise anaeróbica. Isso se

deve ao fato de o lactato ser um substrato menor e mais prontamente substituível como combustível orgânico em contraste com a glicose e não exige a presença de co-fatores como a insulina (BOTTEON, 2012). Este mecanismo pode ser verificado no início do quadro séptico ora estudado (1 HPI) nos pacus infectados, que se utilizaram desta via para obter a energia demandada, com o conseqüente aumento ($p < 0,05$) do lactato plasmático. A este fenômeno seguiu-se a diminuição para níveis basais, provavelmente devido esgotamento das reservas de glicose celular e menos pela diminuição do sistema lactato, pois não houve alteração ($p > 0,05$) da indução da LDH nos diferentes tempos.

Também não é possível atribuir o aumento da concentração de lactato à alguma lesão de musculatura esquelética ou cardíaca, pelo não aumento ($p > 0,05$) da indução da CK, e ao fato de que a maior parte do lactato plasmático é liberado na circulação por transporte ativo pelas membranas, sem necessidade de lesão celular (HALESTRAP e MEREDITH, 2004).

Tuviras, *Gymnotus carapo*, expostas à hipóxia apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, com pico do lactato uma hora após a hipóxia, seguido de diminuição, três horas após a exposição no rim, fígado e músculo. Os autores atribuíram a redução à mecanismos adaptativos da tuvira a ambientes eutrofizados (AVILEZ et al., 2002). Este fato parece ser parte da verdade, uma vez que o estresse causado pela hipóxia induz a liberação da adrenalina, que estimula a via da glicólise aeróbica sem necessidade de hipóxia tecidual (JAMES et al. 1999). O mesmo foi observado em seres humanos com endotoxemia, que aumentaram a lactatemia, sem que houvesse hipoperfusão ou hipóxia (BUNDGAARD et al. 2003). Durante todo o período de observação deste trabalho, os pacus inoculados com *A. hydrophila* não apresentaram sinais clínicos característicos de hipóxia, como se posicionar na superfície ou na saída d'água das caixas e não houve alterações ($p > 0,05$) na quantidade de eritrócitos e hemoglobina, diferindo dos resultados do eritrograma verificados nas tuviras, *G. carapo*, imediatamente após a hipóxia (AVILEZ et al., 2002).

O ácido láctico é ionizado à lactato (BOTTEON, 2012) que, posteriormente, é metabolizado e reconvertido à glicogênio nas células e

tecidos, como nas células germinativas, neurônios e principalmente hepatócitos (STANLEY et al. 1985; GLADDEN, 2004). O restante do ácido láctico é dissociado em ânions e prótons sob pH fisiológico (FITTS, 2003), com aumento do H^+ e leve acidez com posterior redução do cálcio plasmático (FITTS, 2003). No presente estudo, a redução ($p < 0,05$) do cálcio plasmático sucedeu ao aumento dos níveis de lactato, apesar disso, não é possível atribuir a diminuição do cálcio apenas a este fato, mas também pelo cálcio atuar como co-fator e/ou coenzima em diversas reações metabólicas e regular diversas atividades celulares (COX e NELSON, 2014). Esta diminuição da concentração plasmática corrobora os resultados encontrados em carpas inoculadas com *A. hydrophila* (HARIKRISHNAN et al., 2003). Em suma, a sepse altera a homeostase do cálcio por alteração do metabolismo sistêmico e pelo efeito direto do TNF- α e IL-1 sobre diversas células (GLADDEN, 2004; SILVA e VELASCO, 2007).

O fígado participa do metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios (GUYTON e HALL, 2011). Devido a isso, todas as alterações no catabolismo pelas diferentes vias metabólicas, verificadas no perfil bioquímico dos pacus sépticos, favoreceram a disfunção hepática, identificada pelo aumento ($p > 0,05$) do extravasamento das enzimas ALT e AST. A disfunção hepática é comum durante o processo séptico (JACOBI, 2002) e a patogenicidade é multifatorial (VERMILLION et al., 1969).

As lesões nos hepatócitos, neste ensaio, podem ser atribuídas ao efeito direto das bactérias nas células, uma vez que a bacteremia foi diagnosticada pela identificação e quantificação bacteriana no sangue ($p < 0,05$). No início do processo, 1 HPI, o aumento ($p < 0,05$) da ALT nos peixes pode ser consequência do efeito de toxinas produzidas pela *A. hydrophila*, como hemolisina (HOWARD e BUCKLEY, 1985; CHOPRA et al., 2000), enterotoxinas (SHOTTS et al., 1985; DEL CORRAL et al., 1990) e fator dermonecrótico (CAHILL, 1990), proteases que causam rompimento das membranas celulares, que são liberadas na cavidade celomática e no sangue. Subsequentemente, o agravamento da infecção ($p < 0,05$) foi evidenciado pelo aumento da injúria hepática, confirmado pelo aumento ($p < 0,05$) das concentrações sérica de ALT e AST, 9 HPI. Este dado coincide com o observado nos tempos de maior quantidade de bactérias

($p < 0,05$) na corrente sanguínea dos pacus. Assim, a lesão dos hepatócitos ocorre pela ação direta da *A. hydrophila*, confirmada pela imunomarcagem com IgY-anti *A. hydrophila* (dados não apresentados) e a lesão indireta, pelo aumento do infiltrado inflamatório no local da injúria, desencadeado pela liberação de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, no sítio de infecção (FRACASSO, 2008). A bacteremia está associada à lesão hepática e alteração do perfil bioquímico (BANKS et al., 1982; SIKULER et al., 1989) e descritos entre os achados histopatológicos de pacientes com sepse antes e após a morte (KOSKINAS et al., 2008).

No presente estudo não foi verificada liberação ($p > 0,05$) das enzimas FA e GGT, indicando que os peixes não desenvolveram colestase. Diferindo dos achados de Borges (1996) e de Koskinas et al. (2008). Entretanto, a ausência de colestase não permite afirmar que os pacus não desenvolveram tal quadro, talvez essa ausência seja pelo tempo de colheita, insatisfatório, que não permitiu que houvesse a liberação de tais enzimas pelos pacus.

A inoculação da *A. hydrophila* no sítio primário desencadeia o aumento da liberação dos mediadores químicos pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), inicialmente, no foco infeccioso pelos leucócitos e pelas células endoteliais (NDUKA e PARRILLO, 2011), com pronto recrutamento e acúmulo de leucócitos no local do foco inflamado (BOZZO et al., 2007; CLAUDIANO et al., 2013; CASTRO et al., 2014).

Esta sequência de eventos, observa-se na leucopenia nos pacus 1HPI, sugerindo o recrutamento dos leucócitos do compartimento circulatório para o foco infeccioso e/ou a aderência ao endotélio no compartimento marginal. Esta leucopenia se manteve significativa ($p < 0,05$) durante o período experimental em relação ao grupo controle.

O conjunto de dados supra descrito aponta na direção de que os pacus inoculados com *A. hydrophila* apresentaram quadro de sepse grave, evidenciado dentre outras variáveis supracitadas pela alteração do leucograma (BONE, 1991).

A sepse é caracterizada pela produção excessiva e desordenada de mediadores inflamatórios, resultando em anarquia metabólica, na qual “o próprio organismo não consegue controlar o que ele próprio criou” (BONE,

1991). Esta desordem causa alterações nas variáveis hematológicas, que dificulta comparações intra e entre espécies de teleósteos, evidenciadas por controvérsias na literatura (HARIKRISHNAN et al., 2003; MARTINS et al., 2008; GARCIA e MORAES, 2009; DA SILVA, 2010).

Espécies diferentes de teleósteos inoculadas sob mesmas condições com *A. hydrophila* (via i.c., 10^6 UFC/ μ L), apresentam perfis diferentes no leucograma. Em carpas, *Cyprinus carpio*, ocorre leucocitose com 10, 20 e 30 dias após o inóculo com $100 \mu\text{L} / 10^6$ UFC (HARIKRISHNAN et al., 2003); pacus inoculados $0,2 \text{ mL} / 10^6$ UFC apresentaram leucopenia 24 horas após a inoculação (GARCIA e MORAES, 2009).

Garcia e Moraes (2009) verificaram respostas semelhantes aos encontrados neste trabalho, com os sinais clínicos de aeromonose e de leucopenia. Apesar disso, uma diferença marcante entre os trabalhos, foi o tempo de coleta e a intensidade da resposta. Neste trabalho, as avaliações do sangue foram feitas até 9 HPI, pois com 24 HPI, 68 % dos animais vieram a óbito, e essa diferença pode ser atribuída à dose infectante. Os resultados deste trabalho, os de Harikrishnan et al. (2003) e de Garcia e Moraes (2009) mostraram que a dose infectante pode exercer efeitos marcantes sobre a cinética dos leucócitos e sobre a mortalidade em peixes. A leucopenia verificada neste ensaio mostrou prognóstico ruim para pacus sépticos. Em pacientes humanos, a diminuição dos leucócitos circulantes é considerada como prognóstico desfavorável (BORGES, 1996) e o quadro mais comum observado em mamíferos é de leucocitose (BERNARD et al., 2000; TILLEMA et al., 2000; HELLER et al., 2001; HILLMAN e AULT, 2002; SALGADO et al., 2007; SANTOS et al., 2013).

Neste estudo, as principais alterações morfológicas identificadas nas extensões sanguíneas foram eritrócitos com hipocromia e anisocitose; presença de células imaturas com intensa basofilia e poiquilocitose. Em leucócitos foram observados vários graus de vacuolização, lesões tóxicas e anisocitose, além de raros granulócitos em atividade fagocitária. Estas alterações são associadas com a resposta inflamatória aguda (THRALL et al., 2012), hemocultura positiva (SALGADO et al., 2007) e aumento da atividade dos neutrófilos (BERNSTEIN et al., 2001; AIRD, 2003). Estes achados citológicos assemelham-se aos encontrados em diferentes

espécies de teleósteos acometidos por bacterioses (SATAKE et al., 2009; PÁDUA et al., 2010) e parasitoses (MARTINS et al., 2004; TAVARES-DIAS et al., 2008).

O rápido recrutamento dos leucócitos circulantes para o foco infeccioso foi evidenciado pela diminuição do número de linfócitos, granulócitos e monócitos com 1 HPI ($p < 0,05$) quadro mantido ($p < 0,05$) até 3 HPI por linfócitos e granulócitos. Os monócitos, após o primeiro aumento, voltaram aos níveis basais ($p > 0,05$), provavelmente porque estas células, mesmo na ausência de infecção, migram para os tecidos (WAGNER e ROTH, 2000; KUBES, 2002).

A disseminação bacteriana verificada no sangue dos pacus 6 e 9 HPI ($p < 0,05$) foi acompanhada da reestabilização do número de linfócitos e granulócitos circulantes, não diferindo ($p > 0,05$) do controle, fato que sugere parada da quimiotaxia de leucócitos para o foco infeccioso. Este cessar na migração é descrito na literatura como falência da atividade quimiotóxica dos neutrófilos em decorrência de fenômenos multifatoriais (BENJAMIN et al., 2000; SECHER et al., 2009).

Neste trabalho, provavelmente produtos bacterianos e mediadores químicos oriundos do foco infeccioso atingiram o sangue circulante e provocaram a ativação de leucócitos, com aumento da produção EROs verificada o máximo 3 HPI ($p < 0,05$) e também diferentes graus de vacuolização e lesões tóxicas graves das células brancas dos pacus (Figura 5d). Depois de 6 e 9 HPI, houve aumento ($p < 0,05$) da bacteremia e da toxemia, concomitante com a falência da quimiotaxia dos leucócitos sanguíneos ($p < 0,05$), diminuição ($p < 0,05$) da produção EROs e inalteração dos níveis de lisozima plásmatica ($p > 0,05$). Estas alterações podem ser decorrentes da fosforilação excessiva dos receptores quimiotáxicos dos leucócitos, que leva a dessensibilização e internalização (ARRAES et al., 2006; RIOS-SANTOS et al., 2007),

Os resultados aqui verificados assemelham-se aos observados em pacientes humanos com sepse, onde a menor produção e a liberação de EROs e citocinas pró-inflamatórias são atribuídas a disfunção dos leucócitos (SPEAR et al., 1989; MUNOZ et al., 1991).

Em carpas, *Labeo rohita*, estimuladas com níveis crescentes de LPS purificado de *Escherichia coli*, quando induzidas com doses menores apresentaram aumento das EROs, mieloperoxidase e lisozima, e nos estimulados com doses maiores, diminuição destas variáveis (NAYAK et al., 2008). A cinética da produção de EROs em macrófagos de *Dicentrarchus labrax in vitro*, estimulados com LPS e ativados por PMA demonstrou que o máximo da liberação ocorre até 3 HPI e é seguida de diminuição até 24 HPI (SARMENTO et al., 2004). Os resultados deste ensaio corroboram com ambos os trabalhos citados, quanto a máxima da liberação de EROs 3 HPI e aumento da disseminação 6 e 9 HPI, além da seguida diminuição da produção de EROs por leucócitos. A diferença de concentração de lisozima sérica ($p > 0,05$) entre os trabalhos pode ser decorrente da maior intensidade do estímulo ora utilizada, que agravou a disfunção dos leucócitos sanguíneos.

Os resultados da ALS mostram que o máximo da atividade lítica do soro ocorreu 6 e 9 HPI, subsequente à diminuição da quimiotaxia dos leucócitos. O aumento na lise da bactéria é decorrente do aumento da quantidade de grânulos liberados, que contém substâncias bactericidas (URIBE et al., 2011). No entanto, não foi verificada alteração ($p < 0,05$) da quantidade de lisozima sérica. Assim, provavelmente o aumento e manutenção da ALS ($p < 0,05$), seja decorrente da ativação do sistema complemento pelas vias alternativa e clássica (HOLLAND e LAMBRIS, 2002).

Outra evidência do possível aumento da ação do sistema complemento é o aumento ($p < 0,05$) da AAB com 6 e 9 HPI, podendo ter sido intensificado com a ativação do sistema complemento pela via clássica. Pelos intervalos das coletas não houve tempo suficiente para expansão clonal, descrita após 21 dias em tilápias-do-nilo (FERNANDES et al., 2015).

Assim o aumento progressivo da AAB observado neste trabalho pode ser atribuído ao aumento da liberação de anticorpos naturais pela estimulação das células B-1, principais produtoras de anticorpos, timo independente (MURAKAMI et al., 1994). Estas, mesmo em condições normais, são uma fonte rápida de produção espontânea de IgM (ABBAS, 2014). Em teleósteos os anticorpos naturais encontram-se em altas concentrações no soro, promovendo imediata resposta contra bactérias e

vírus (WHYTE, 2007). O aumento dos títulos séricos de AAB observados em relação ao grupo controle deste estudo, corrobora com os encontrados em truta (NAKHLA, 1997), carpa (SELVARAJ, 2004) e híbrido de surubim (DA SILVA, 2010) após a infecção experimental por *A. hydrophila*.

Contudo, mesmo com o aumento ALS e AAB, a diminuição dos mecanismos de defesa celular analisados, favoreceram o aumento da disseminação da *A. hydrophila*, identificado pela aumento ($p < 0,05$) da quantidade de bactérias no sangue. Os níveis do ferro sérico se manteve reduzido, mesmo após diminuição do EROs, falência na quimotaxia e aumento da lesão hepática, provavelmente mantida pelo consumo do metabolismo bacteriano, que se encontrava na fase logarítima de crescimento, 6 HPI (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). Este eletrólito é essencial para a disseminação bacteriana (ELLIS, 2001; STAFFORD e BELOSEVIC, 2003). A hipocromasia das hemácias também é indicio da menor disponibilidade de ferro circulante (Figura 5 a). Estes resultados assemelham-se aos encontrados em tilapia-do-nilo inoculadas com *Streptococcus agalactiae*, onde verificaram a redução no ferro sérico 12 HPI, correlacionando com o aumento da expressão da transferrina no fígado no mesmo momento. Entretanto a infecção parece ter sido menos aguda, pois, não relataram mortalidade após 168 HPI (POOCHAI et al., 2014).

Não se observou melhora do quadro clínico dos animais, em vista das variáveis analisadas e dos sinais clínicos apresentados. Some-se a estas a redução do número de trombócitos, que em peixes, além de atuar na coagulação, também participa da resposta imune inata (HILL e ROWLEY, 1996; BURROWS et al, 2001; TAVARES-DIAS & MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2007).

A diminuição do número de trombócitos 3 e 9 HPI pode ser explicada, em parte, pelo acúmulo no foco infeccioso, como descrito na resposta inflamatória aguda na mesma espécie inoculada com *A. hydrophila* inativada (BOZZO et al., 2007; CLAUDIANO et al., 2013) e em tilápias inoculadas com *Streptococcus agalactiae* inativado (SALVADOR et al., 2012; CASTRO et al., 2014) e/ou pelo consumo desta células pela ativação

do sistema de coagulação como tampão hemostático ou coágulo de fibrina (HILL e ROWLEY, 1996; LÓPEZ-AGUIRRE e PÁRAMO, 1999; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

No teste de coagulação ativa não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos. Apesar disso a trombocitopenia ($p < 0,05$), o aumento do hematócrito (9 HPI; $p < 0,05$) e as petéquias na superfície dorsal do corpo próximos ao local da inoculação dos pacus 9 HPI são indícios de alteração vascular (CONTRAN et al., 2010). A não detecção pelo teste de coagulação ativa pode ser devida à baixa sensibilidade do teste.

Todas as variáveis analisadas neste trabalho atuam e sofrem consequências da ativação e lesão do endotélio vascular causada pela aderência dos leucócitos (RANDOW et al., 1995), ação de radicais livres (MIRANDA et al., 2004), liberação das citocinas pró-inflamatórias (FONG et al., 1990; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011), ativação neuroendócrina (NARDOCI et al., 2014) por ação da bactéria e suas toxinas (MOLDAWER, 1994; HINSHAW, 1996; SALES Jr et al., 2006).

A lesão e a ativação endotelial na sepse e no choque séptico, culminando na instalação da coagulação intravascular disseminada (CID) (LÓPEZ-AGUIRRE e PÁRAMO, 1999; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011), ocorre por disfunção endotelial progressiva e pelo aumento da permeabilidade vascular, transudação para os órgãos (TRACEY et al., 1988; PETRAK et al., 1989) e elevação do débito cardíaco (PARRILO, 1993; METRANGOLO et al., 1995).

A hipoperfusão resultante dos efeitos combinados da vasodilatação disseminada, decorrente da ação dos mediadores químicos ON, TNF- α , IL-1, bradicinina, histamina, prostaglandinas, falência da bomba miocárdica e CID, induzem a falência múltipla dos órgãos (GLAUSER, 2000; HARDAWAY et al., 2001, CONTRAN et al., 2010). Estes eventos podem explicar o agravamento do quadro clínico dos pacus, com consequente início da mortalidade 12 HPI até 36 HPI, resultando em menor taxa de sobrevivência no final do período experimental (5 dias) de 57,14 %.

5. Conclusões

Os resultados obtidos deste trabalho permitem concluir que:

- Após indução da sepse pela *A. hydrophila* em pacus ocorreu aumento imediato da concentração de cortisol sérico, seguido decréscimo da cortisolemia, reestabelecendo os níveis basais 6 e 9 HPI;
- No pacu a sepse causou hiperglicemia imediata e transitória, seguida de hipoglicemia;
- Com a inoculação de *A. hydrophila* observou-se declínio progressivo de T_3 durante todo processo. Os níveis de tiroxina comportaram-se de modo bifásico, com diminuição, seguida de aumento, após 6 HPI nas concentrações séricas;
- A sepse em pacu induziu alterações nas vias metabólicas com aumento do catabolismo protéico, lipídico, utilização da via da glicólise anaeróbica e lesão hepática;
- O leucograma de pacus sépticos apresentou redução leucócitos. O trombograma apresentou diminuição do número de trombócitos. Após 6 e 9 HPI, observou-se o cessar da quimiotaxia dos leucócitos concomitante com o aumento da disseminação bacteriana;
- As principais alterações morfológicas identificadas nas extensões sanguíneas dos pacus durante a sepse foram: eritrócitos com hipocromia e anisocitose; presença de células imaturas com intensa basofilia e poiquilocitose, vários graus de vacuolização e lesões tóxicas em leucócitos;
- As alterações das variáveis imunes inatas evidenciadas no soro foram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos sanguíneos até 3 HPI, seguida de diminuição; aumento da atividade lítica do soro e da atividade de aglutinação bacteriana de maneira crescente com o máximo da atividade 6 e 9 HPI e inalteração da concentração da lisozima sérica;

- A inoculação de *A. hydrophila* na cavidade celomática do pacu induziu a sepse, causou alterações clínicas, imuno-endócrinas além de achados laboratoriais inespecíficos e alta taxa de mortalidade (72%) e sobrevida de 57,14 %.

6. Bibliografia

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. Paperback, 8ed. 2014, 514p.

AIRD, W.C. The hematologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis. **Mayo Clinical Procedures**, v.78, n.7, p.869-81, 2003.

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Critical Care Medicine**, v.20, n.6, p.864-74, 1992.

AMERSFOORT, E.V.; VAN BERKEL, T.J.C.; KUIPER, J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n. 3, p.379, 2003.

ALBERT, M.L.; PEARCE, S.F.A., FRANCISCO, L.M., SAUTER, B., ROY, P., SILVERSTEIN, R.L., et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via av b5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.188, p. 1359-68, 1998.

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

ARRAES, S.M.; FREITAS, M.S.; DA SILVA, S.V.; DE PAULA NETO, H.A.; ALVES-FILHO, J.C.; AUXILIADORA MARTINS, M.; BASILE-FILHO, A.; TAVARES-MURTA, B.M.; BARJA-FIDALGO, C.; CUNHA, F.Q. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition

of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, v. 108, n.9, p.2906-2913, 2006.

AVILEZ, I.M.; ALTRAN, A.E.; BARBOSA, C.C. Biochemical and hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) exposed to environmental hypoxiamoraes. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, n. 4A, p. 633-640, 2002.

BABA, T.; IMAMURA, J.; IZAWA, K.; IKED, K. Cell-mediated protection in carp, *Cyprinus carpio L.*, against *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Fish Diseases**, v. 11, p. 171-8, 1988.

BAGBY, G.J.; PLESSALA, K.J.; WILSON, L.A.; THOMPSON, J.J.; NELSON, S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 83-88, 1991.

BALM, P.H.M.; PEPELS, P.; VAN LIESHOUT, E.; BONGA, SEW. Neuroimmunological regulation of α -MSH release in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 11, p.125-30, 1993.

BALM, P.H.; VAN LIESHOUT, E.; LOKATE, J.; WENDELAAR BONGA, S.E. Bacterial lipopolysaccharide (LPS) and interleukin 1 (IL-1) exert multiple physiological effects in the tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 165, p. 85-92, 1995.

BANKS, J.G.; FOULIS, A.K.; LEDINGHAM, I.M.; MACSWEEN, R.N. Liver function in septic shock. **Journal of Clinical Pathology**, v. 35, p. 1249-1252, 1982.

BARBOSA, L.M.G. **Avaliação de respostas metabólicas e de imunidade inata em pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) alimentados**

com dietas suplementadas com vitamin E e submetidos à variação de temperatura. 2011. 122 f. Dissertação – Universidade Federal de São Carlos.

BAYRAK, A.; BAYRR, A.; KARABULUT K.U. Effects of thyroid hormones on major cardiovascular risk in acute coronary syndromes. **Critical Care**, v.15, p. 1:2, 2011.

BENJAMIM, C.F.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 82, p. 214-223, 2000.

BERCZI, I.; BERTOK, L.; BEREZNAI, T. Comparative studies on the toxicity of bacterial endotoxins. **Annual Review of Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 1070-91, 1966.

BERNARD, J.; LEVY, J.P.; VARETI, B.; CLAUVEL, J.P.; RAIN, J.D.; SULTAN, Y. **Hematologia**. São Paulo: Editora Medsi, 2000. 300p.

BERNSTEIN, H.M.; POLLOCK, B.H.; CALHON, D.A.; CHRISTENSEN, R.D. Administration of recombinant granulocyte colony-stimulating factor to neonates with septicemia: a meta-analysis. **Journal of Pediatrics**, v. 138, p. 917-20, 2001.

BOCHUD, P.V.; CALANDRA, T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. **BMJ**, v. 326, p. 262-6, 2003.

BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 38–89, 2002.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D.A. Alterações histológicas e comportamentais provocadas pela inoculação de suspensão bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v. 31, p. 687-694, 2001.

BOLLER, E.M.; OTTO, C.M. Sepsis. In: Silverstein, D.C. Hopper. **Small Animal Critical Care Medicine**, St Louis: Elsevier, v. 106, p. 454-456, 2009.

BONE, R.C. The pathogenesis of sepsis. **Annals of Internal Medicine: Journal**, v. 115, p. 457-469, 1991.

BORGES, L.A.A. Choque séptico. **Clínica Brasileira Medicina Intensiva**, v. 1, p. 101-107, 1996.

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J.O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 239–262, 2006.

BOTTEON, P.T.L. Lactato na medicina veterinária - atualização conceitual. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 34, n. 4, p. 283-287, 2012.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama agricultural experiment station, Auburn University, AL, 1990.

BOZZO, F.R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; PEREIRA, G. T.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887 (characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 302-308, 2007.

BRANCO, R.G.; TASKER, R.C.; GARCIA, P.R.C.; PIVA, G.P.; XAVIER, L.D. Glycemic control and insulin therapy in sepsis and critical illness. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, 2007.

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura**, Brasil, 2014.

BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura**, Brasil, 2011.

BUNDGAARD, H.; KJELDESEN, K.; KRABBE, K.S.; VAN HALL, G.; SIMONSEN, L.; QVIST, J.; HANSEN, C.M.; MØLLER, K.; FONSMARK, L.; MADSEN, P.L.; PEDERSEN, B.K. Endotoxemia stimulates skeletal muscle Na⁺-K⁺-ATPase and raises blood lactate under aerobic conditions in humans. **American Journal of Physiology**, v. 284, p. 1028–1034, 2003.

BURROWS, A.S.; FLETCHER, T.C.; MANNING, M. J. Haematology of turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, p. 77–84, 2001.

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

CAHILL, M.M. Virulence factors in motile *Aeromonas* – A review. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 1-16, 1990.

CARVALHO, P.R.A.; TROTTA, E. A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepsse. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 195-204, 2003.

CHOPRA, A.K.; GRAF, J.; HORNEMAN, A.J.; JOHNSON, J. Virulence factor activity relationships (VFARs) with specific emphasis on *Aeromonas* species based on October, 2004 Workshop in Baltimore, Maryland. U. S. Environmental Protection Agency, **Office of research and Development**, 2004.

CHOPRA, A.K.; XU, X.J.; RIBARDO, D.; GONZALEZ, M.; KUHL, K.; PETERSON, J.W.; HOUSTON, C.W. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates

arachidonic acid metabolism in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2808-2818, 2000.

CIANCIARULLO, M.A.; CECCON, M.E.J; YAMAMOTO, L.; NEGRO, G. M.B.D.; OKAY, T.S. Mediadores pró-inflamatórios e antinflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Revista brasileira crescimento e desenvolvimento humano**. v.18, n.2, p. 135-142, 2008.

CINEL, I., DELLINGER, R.P. Advances in pathogenesis and management of sepsis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 20, p. 345–52, 2007.

CIPRIANO, C.R. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **Revision of Fish Disease Leaflet 68** (1984), "*Aeromonas Hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish," por R. C. Cipriano, G. L. Bullock e S. W. Pyle.

CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; MANRIQUE, W.G.; MARCUSSO, P.F.; CASTRO, M.P.; LOUREIRO, B.A.; BELO, M.A.A.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines. **Fish Shellfish Immunology**, v. 4, p. 01-06, 2013.

CLAUDIANO, G.S.; FERNANDES, D.C.; ETO, E.F.; SHIMADA M.T.; MANRIQUE W.G.; AGUINAGA J.F; SALVADOR R.; MORAES, J.R.E.; MORAES F.R. evaluation LD50 (LD (i) (50-96h)) and first report of neuropathological in *Piaractus mesopotamicus* inoculated with different concentration of *Aeromonas hydrophila*. In: **World Aquaculture Society**, Adelaide, Australia. Anais. 2014.

CLEVELAND, P. HICKMAN JR. **Princípios Integrados de Zoologia - 15ª Edição**- Guanabara Kooglan, Rio Janeiro, 2013.

COX, M.; NELSON, D.L. **Lehninger Principles of Biochemistry**, Fourth Edition, USA, 2014.

CONTRAN, K.V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 4ª. Elsevier. 2010, 49p.

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

DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GINSBERG, H. S. **Microbiology**. 4. ed. Philadelphia: Kyoto, cap. 27, p. 561-587, 1990.

DE GROOT, L.J. Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 84, p. 151–164, 1999.

DEL CORRAL, F.; SHOTTS, E.B.; BROWN, J. Adherence haemagglutination and cell surface characteristics of motile aeromonads virulent for fish. **Journal of fish Diseases**, v. 13, p. 255-268, 1990.

DESCAMPS, D.; GARS, M.; BALLOY, V.; BARBIER, D.; MASCHALIDI, S.; TOHME, M. Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1b secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 109, p. 1619-24, 2012.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112, p. 321-329, 1997.

DINARELLO, C.A. Anti-Cytokine Therapies in Response to Systemic Infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, p. 244–250, 2001.

DOCTER, R.; KRENNING, E.P.; DE JONG, M.; HENNEMANN, G. The sick euthyroid syndrome: changes in thyroid hormone serum parameters and hormone metabolism. **Clinical Endocrinology**, v. 39, p. 499–518, 1993.

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

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 827-839, 2001.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I.R. Structure and function of lipopolysaccharide. **Microbes and Infections**, v. 4, p. 837-41, 2002.

FERNANDES, D.C.; ETO, S.F.; CLAUDIANO, G.S.; MARCUSO, P.F.; VIEIRA, F.C.F.; SHIMADA, M.T.; SILVA, T.F.A.; SOUZA, E.C.; SALVADOR, R.; MORAES, J.R.E; MORAES, F.R. Humoral immune response in *Oreochromis niloticus*: modified direct agglutination test. **Comparative Clinical Pathology**, v. 24, n. 3, p. 617-623, 2015.

FISCHER, U.; UTKE, K.; SOMAMOTO, T.; KOLLNER, B.; OTOTAKE, M.; NAKANISHI, T. Cytotoxic activities of fish leucocytes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 209–226, 2006.

FITTS, R.H. **Mechanisms of muscular fatigue**. In **Principles of Exercise Biochemistry**, 3rd edn, ed. Poortmans JR, pp. 279–300. Karger, Basel, 2003

FONG, Y.; MOLDAWER, L.L.; SHIRES, G.T.; LOWRY, S.F. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. **Surgery Gynecology Obstetrics**, v. 170, p. 363-378, 1990.

FRACASSO, J.F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Revista de Ciência Farmarmacia Básica Aplicada**, n. 29, p. 119-127, 2008.

FREUNDENBERG, M.A. The fate of lipopolisaccharides in rats: evidence for chemical alteration in the molecule. **Reviews of infectious diseases**, v. 6, p. 483-7, 1984.

GARCÍA-CASTILLO, J.; CHAVES-POZO, E.; OLIVARES, P.; PELEGRÍN, P.; MESEGUER J.; MULERO V. The tumor necrosis factor α of the bony fish seabream exhibits the in vivo proinflammatory and proliferative activities of its mammalian counterparts, yet it functions in a species-specific manner. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 1331–1340, 2004.

GARCIA, F.; MORAES, F.R. Hematologia e sinais clínicos de de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, v. 31, p. 1:17-21, 2009.

GAZOLA, R.; BORELA, M.I.; DONALDSON, E.M., VAL-SELLA, M.V.; SUKUMASAVIN, N.; FAVA-DE-MORAES, F.; BERNARDINO, G. Plasma steroid and corticosteroid levels in female pacu *Piaractus mesopotamicus*, Teleostei-Characidae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 659-664, 1996.

GLADDEN, L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **The Journal of Physiology**, v. 558, p. 5-30, 2004.

GLAUSER, M. Pathophysiologic basic of sepsis: considerations for future strategies of intervention. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 1, p. 4-8, 2000.

GLAUSER, M.P. Pathophysiology basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. **Critical Care Medicine**, v. 28, p. 4-8, 2000.

GOH, L.; JEWELLA, T.; LAVERSUCHA, C.; SAMANTA, A. Análise sistemática da influência do antifator de necrose tumoral (anti-TNF) sobre as taxas de infecção em pacientes com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 501– 515, 2013.

GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. Identification and molecular characterization of the interleukin-10 receptor 1 of the zebrafish (*Danio rerio*) and the goldfish (*Carassius auratus* L.). **Developmental and Comparative Immunology**. V. 36, p. 408–417, 2012a.

GRAYFER, L.; WALSHC, G.J.; BELOSEVICA, M. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor- α . **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 532–543, 2008b.

GUYTON, A.C.; HALL, E.J. **Of Medical Physiology** - 12^a Ed, Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania, 2011.

HALESTRAP, A.P.; MEREDITH D. The SLC16 gene family from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 447, p. 619-628, 2004.

HARDAWAY, R.; WILLIAMS, C.; VASQUEZ, Y. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. **Seminars Thrombosis Hemostasis**, v. 27, n.6, p. 577-584, 2001.

HARVEY, JONH W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. 2012.

HARIKRISHNAN, M.; NISHA RANI, C. Balasundaram Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection R. **Aquaculture**, v. 221, p. 41–50, 2003.

HART, B.B.; STANFORD, G.G.; ZIEGLER, M.G.; LAKE, C.R.; CHERNOW, B. Catecholamines: study of interspecies variation. **Critical Care Medicine**, v. 17, p. 1203-1222, 1989.

HELLER, A.R.; GROTH, G.; HELLER, S.C. N-acetylcystein reduces respiratory burst but augments neutrophil phagocytosis in intensive care unit patients. **Critical Care Medicine**, v. 29, p. 272-6, 2012.

HILL, D.J.; ROWLEY, A.F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **British Journal of Haematology**, v. 92, n. 200–21, 1996.

HILLMAN, R.S.; AULT, K.A. **Hematology in Clinical Practice**. McGrawHill Companies. p.630. 2002.

HINSHAW, L.B. Sepsis / Septic shock: Participation of the microcirculation: Na abbreviated review. **Critical Care Medicine**, v. 24, p. 1072-1078, 1996.

HOLLAND, M.C.; LAMBRIS, J.D. The complement system of teleosts. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, p. 399–420, 2002.

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. In: Brown, L. (Ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Oxford: Press, cap 14: 223-247, 1993.

HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis.

The New England Journal of Medicine, v. 348, p. 138-150, 2003.

HOWARD, S.P.; BUCKLEY, J.T. Activation of the hole-forming toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay.

Infection and Immunity, v. 50, p. 322-323, 1985

HUISIN, M.O., RENE, J.M., HUUB, F.J., SAVELKOULA, B.M., KEMENADEA L.V. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines IL-18 in teleost fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 395–413, 2004.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/institucional/lista-de-especies> aquaticasameacadas-de-extincao. 2013.

IMMENSCHUH, S.; RAMADORI, G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1121-1128, 2000.

ILIEV, D.B.; LIARTE, C.Q.; MACKENZIE, S., GOETZ, F.W. Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents. **Molecular Immunology**, v. 42, p. 1215-23, 2005.

INGRAHAM, R.H.; STANLEY, R.W.; WAGNER, W.C., Seasonal effects of tropical climate on shaded and non-shaded cows as measured by rectal temperature, adrenal cortex hormone, thyroid hormone and milk production. **American Journal Veterinary Research**, v.40, p.1792-1797, 1979.

JACOBI, J. Pathophysiology of sepsis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 59, n. 1, p. 3-8, 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p. 332-344. 175, 1998.

JAMES, J.H.; LUCHETTE, F.A.; MCCARTER, F.D. FISCHER, J.E. Lactate is an unreliable indicator of tissue hypoxia in injury or sepsis. **Lancet**, v. 354, p. 505–508, 1999.

KARLSSON, S.; VARPULA, M.; RUOKONEN, E.; PETTILA, V.; PARVIAINEN, I.; ALA_KOKKO, T.I.; KOLHO, E.; RINTALA, E.M. Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland; the Finnsepsis study. **Intensive Care med**, v. 33, p. 435-43, 2007.

KLARESKOG, L.; CATRINA, L.A.; PAGET, S. Rheumatoid arthritis, **Lancet**, v. 373, p. 659-72, 2009.

KEEL, M.; TRENTZ, O. Pathophysiology of polytrauma. **Injury**, v. 36, p. 691–709, 2005.

KNOBEL, E. **Conduas no Paciente Grave**. 3a ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 2841p. SEÇÃO 2 – Choque e distúrbios hemodinâmicos, Cap. 3: Fisiopatologia do choque e da disfunção de múltiplos órgãos, p. 41 – 60. Cap. 4: Sepsis e choque séptico, p. 61 – 78. SEÇÃO 3 – distúrbios cardiovasculares, Cap. 17: Interdependência ventricular, p. 265 – 270.

KOSKINAS, J.; GOMATOS, I.P; TINIAKOS, D.G.; MEMOS, N.; BOUTSIKOU, M.; GARATZIOTI, A.; ARCHIMANDRITIS, A.; BETROSIA, A. Liver histology in ICU patients dying from sepsis: A clinico-pathological study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 7; n. 14, p. 1389-13937, 2008.

KUBES, P. The complexities of leukocyte recruitment. **Seminars of Immunology**, v. 14, n. 2, p. 65-72, 2002.

LAFORCADE, A.M.; FREEMAN, L.M.; SHAW, S.P.; BROOKS, M.B.; ROZANSKI, E.A.; RUSH, J.E. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**; v. 17, n.5, p. 674-9, 2003.

LÓPEZ-AGUIRRE, Y.; PÁRAMO, J.A. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. **Thrombosis Research**, v. 94, n.2, p. 95-10, 1999.

LEVY, M. M.; FINK, M.P.; MARSHALL, J.C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S.M.; VINCENT, J.L.; RAMSAY, G. 2001 SCCM/ESICM/ ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, p. 1250 –1256, 2003.

LYNN, W.A.; GOLENBOCK, D. Lipopolysaccharide antagonists. **Immunology**. v. 13, p. 271-76, 1992.

LORENZON, S.; GIULIANINI, P.G; FERRERO, E.A. Lipopolysaccharide-Induced Hyperglycemia is Mediated by CHH Release in Crustaceans. **General and Comparative Endocrinology**, v. 108, p. 395–405, 1997.

LU, X.J.; CHEN, J.; HE, Y.Q.; SHI, Y.H. Molecular characterization of an IL-1 β gene from ayu, *Plecoglossus altivelis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, p. 1253-1259, 2013.

MACKENZIE, S.; MONTSERRAT, N.; MAS, M; ACERETE, L.; TORT, L.; KRASNOV, A. Bacterial lipopolysaccharide induces apoptosis in the trout ovary. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 46-58, 2006.

MADDEN, N.P.; LEVINSKY, R.J.; BAYSTON, R.; HARVEY, B.; TURNER, M.W.; SPITZ, L. Surgery, sepsis, and nonspecific immune function in neonates. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 24, n. 6, p. 562–566, 1989.

MAGNONI, L.J.; ROHER, N.; CRESPO, D.; KRASNOV, A.; PLANAS, J.V. In Vivo Molecular Responses of Fast and Slow Muscle Fibers to Lipopolysaccharide in a Teleost Fish, the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biology**, v. 4, n.1, p. 67-87, 2015.

MANRIQUE, W.G.; CLAUDIANO, G.S.; CASTRO, M.P.; PETRILLO, T.P.; MAYRA, A.P.F.; BELO, M.A.A; MARÍA, I.Q.B.; MORAES, J.E.R.; MORAES, F.R. Expression of Cellular Components in Granulomatous Inflammatory Response in *Piaractus mesopotamicus* Model. **PLOS ONE**, v. 26, p. 1-8, 2015.

MARTIN, G.S.; MANNINO, D.M.; EATON, S. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1546-5, 2003.

MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A.M.B.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE-NETO, C.C.; PEREIRA-JR, G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 3, p. 657-661, 2008.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK, J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória em *Oreochromis niloticus* submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim Insituto de Pesca**, v. 30, p. 1:71-80, 2004.

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

McDONALD, L.E. **Veterinary endocrinology and reproduction**, 3.ed. Philadelphia: Lea and Febiger. 173-174, 1980.

MELO, G.; NIKOLIK, G. Brazilian Aquaculture – a Seafood Industry Giant in the Making. **Rabobank Industry Note**, 362. 11p. 2013.

METRANGOLO, L.; LORENA, M.D.; FIORILLO, M.M.D.; FRIEDMAN, G.M.D.; SILANCE, P.M.D.; KAHN, R.J.M.D; NOVELLI, G.P.M.D.; Vincent, J.M.D. Early hemodynamic course of septic shock. **Critical Care Medicine**, 23: 1971-1975, 1995.

MIRANDA, L.E.C; VIARO, F.; CENEVIVA, R.; EVORA, P.R.B. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n.1, p. 1-12, 2004.

MIZOCK, B.A. Alterations in fuel metabolism in critical illness: hyperglycaemia. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 15, p. 533-51, 2001.

MOLDAWER, L.L. Biology of proinflammatory cytokines and their antagonists. **Critical Care Medicine**, v. 22, p. 3-7, 1994.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições pre-disponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: J.E.P. CYRINO; E.C. URBINATI; D.M. FRACALOSI; N. CASTAGNOLLI. (Org.). **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. 1ed.São Paulo: Editora TecArt, v. 1, p. 343-386, 2004.

MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E. **Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico**. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, p. 625-723, 2009.

MUNOZ, C.; CARLET, J.; FITTING, V.C.; MISSET, B.; BLEROT, J.P.; CAVAILLON, J.M. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 1747-54, 1991.

MURAKAMI, M.; TSUBATA, T.; SHINKURA, R.; NISITANI, S.; OKAMOTO, M.; YOSHIOKA, H.; USUI, T.; MIYAWAKI, S.; HONJO, T.J. Oral administration of lipopolysaccharides activates B1 cells in the peritoneal cavity and lamina propria of the gut and induces autoimmune symptoms in an autoantibody transgenic mouse. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 111-121, 1994.

MURATORI, M.C.S.; MARTINS, N.E.; PEIXOTO, M.T.D.; OLIVEIRA, A.L., RIBEIRO, L.P.; COSTA, A.P.R.; SILVA, M.C.C.; LEITE, R.C. Mortalidade por “septicemia dos peixes tropicais” em tilápias criadas em consorciação com suínos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 658-662, 2001.

NARDOCCI, G.; NAVARRO, C.; CORTÉS, P.P.; IMARAI, M.; MONTOYA, M.; VALENZUELA, B.; JARA, P.; ACUÑA-CASTILLO, C.; FERNÁNDEZ, R. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 2, p. 531–538, 2014.

NKHLA, S.A.; SZALAI, A.J.; BANOUB, J.H.; KEOUGH, K.M.W. Serum anti-LPS antibody production by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to the

administration of free and liposomally-incorporated LPS from *Aeromonas salmonicida*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 7, p. 387-401, 1997.

NAYAK, S.K.; SWAIN, P.; NANDA, P.K.; DASH, S.; SHUKLA, S.; MEHER, P.K. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, p. 394-9, 2008.

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

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L.L. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. **Shock**, v. 16, p. 83–96, 2001.

OPAL, SM, FISHER, CJJ, DHAINAUT, JF. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double blind, placebo-controlled, multicenter trial. **Critical Care Medicine**, v. 25, p. 1115–1124, 1997.

ORTH, D.N.; BOLD, C.R. – **Williams's textbook of endocrinology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 489-531, 1992.

PADKIN, A.; GOLDFRAD, C.; BRADY, A.R. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care unit in England, Wales, and northern Ireland. **Critical Care Medicine**, v. 31, p. 2332-8, 2003.

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

PARSONS, K.J.; OWEN, L.J.; LEE, K.; TIVERS, M.S.; GREGORY, S.P. A retrospective study of surgically treated cases of septic peritonitis in the cat

(2000-2007). **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, n. 10, p. 518-524, 2009.

PARRILO, J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, p. 1471-1477, 1993.

PAULSEN SM, LUNDE H, ENGSTAD RE, ROBERTSEN B. In vivo effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 14, p. 39-54, 2003.

PEETERS,R.P.; WOUTERS, P.J.; VAN TOOR, H.; KAPTEIN, E.; VISSER, T.J.; VAN DEN BERHHE, G. Serum 3,3',5'-triiodothyronine (rT3) and 3,5,3'-triiodothyronine/rT3 are prognostic markers in critically ill patients and are associated with postmortem tissue deiodinase activities. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, p. 4559-4565, 2005.

PEKARY, A.E.; BERG, L.; SANTINI, F.; CHOPRA, I.; HERSHMAN, J.M. Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cell. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 101, p. 31–35, 1994.

PEPELS PPLM, WENDELAAR BONGA SE, BALM PHM. Bacterial lipopolysaccharide (LPS) modulates corticotropin-releasing hormone (CRH) content and release in the brain of juvenile and adult tilapia (*Oreochromis mossambicus*; Teleostei). **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 4479-88, 2004.

PETRAK, R.A.; BALK, R.A.; BONE, R.C. Prostaglandins, cyclo-oxygenase inhibitors and thromboxane synthetase inhibitors in the pathogenesis of multiple systems organ failure. **Critical Care Clinics**, v. 5, p. 303-14, 1989.

PILKIS, S.J.; GRANNER, D.K. Molecular physiology of the regulation of the hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual Review of Physiology**, v. 54, 885-909, 1992.

PIOTO, L. **Brasil tem alto consumo de peixes que podem desaparecer**. UOL, São Paulo, 2014. Disponível em:

<http://noticias.uol.com.br/meio-ambiente/ultimas->

[noticias/redacao/2014/07/09/brasil-tem-alto-consumo-de-peixes-ameacados-de-extincao.htm](http://noticias.uol.com.br/meio-ambiente/ultimas-noticias/redacao/2014/07/09/brasil-tem-alto-consumo-de-peixes-ameacados-de-extincao.htm)

PITTET D, HARBARTH S, SUTER PM, REINHART K, LEIGHTON A, BARKER C. Impact of immunomodulating therapy on morbidity in patients with severe sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, p. 852-7, 1999.

PLEIC I.L., SECOMBES C.J., BIRD S., MLADINEO I. Characterization of three pro-inflammatory cytokines, TNF α 1, TNF α 2 and IL-1 β , in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, p. 98-112, 2014.

POOCHAI, W.; CHOOWONGKOMON, K.; SRISAPOOME, P.; UNAJAK, S.; AREECHON, N. Characterization and expression analysis of the transferrin gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its upregulation in response to *Streptococcus agalactiae* infection. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 1473–1485, 2014.

PRAVEEN K., EVANS D. L., Jaso-Friedmann L. Constitutive expression of tumor necrosis factor- in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 279–291, 2006.

RAETZ CR. **Biochemistry of endotoxins. Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 129-70, 1990.

RANDOW, F.; SYRBE, U.; MEISEL, C.; KRAUSCH, D.; ZUCKERMANN, H.; PLATZER, C.; VOLK, H.D. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 1887-1892, 1995.

RAU, S., KOHN, B., RICHTER, C., FENSKE, N., KÜCHENHOFF, H., HARTMANN, K., HÄRTLE, S., KASPERS, B., HIRSCHBERGER, J. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, p. 253 – 260, 2007.

RAY, A.K.; KUNDU, S.; PRAMANIK, M.; ROY, S.; BISWAS, A. Maintenance of brain thyroid hormone level during peripheral hypothyroid condition in adult rat. **Life Sciences**, v. 79, p. 1450–5, 2006.

RAY, D.; MELMED, S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. **Endocrine Reviews**, v. 18, p. 206–228, 1997.

RIOS-SANTOS, F.; ALVES-FILHO, J.C.; SOUTO, F.O.; SPILLER, F.; FREITAS, A. LOTUFO, C.M.; SOARES, M.B.; DOS SANTOS, R.R.; TEIXEIRA, M.M.; CUNHA, F.Q. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 5, p. 490-497, 2007.

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

RUSSEL JA. Management of sepsis. **The New England Journal of Medicine**. V. 355, n.16, p. 1699-713, 2006.

RODKHUM C, HIRONO I, STORK M, DI LORENZO M, CROSA JH, AOKI T. Putative virulence-related genes in *Vibrio anguillarum* identified by random genome sequencing. **Journal of Fish Diseases**, v. 29, p. 157-66, 2006.

SALES JR, J.A.L.; DAVID, C.M.; HATUM, R. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.

SALGADO, R.G.C; OLIVEIRA, M.F.P.; SANTOS, E.J.M; BRITO JUNIOR, L.C. Importância da presença de granulações tóxicas para o diagnóstico hematológico de septicemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 373-377, 2007.

SALLES M.J.C., SPROVIERI S.R.S., BEDRIKOW R., PEREIRA A.C., CARDENUTO S.L., AZEVEDO P.R.C., SILVA T.M., GOLIN V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, p. 86-92, 1999.

SALVADOR, R.; TOAZZA, C.T.; MORAES, J.R.E; MORAES, F.R. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 98, p. 235–241, 2012.

SALVADOR, R.; CLAUDIANO, G.S.; LOUREIRO, B.A.; MARCUSSO, P.F.; ETO, S.F.; PILARSKI, F.; TOAZZA, C.S.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Desempenho e hematologia de tilápias-do-nylo alimentadas com dieta suplementada com *Saccharomyces cerevisiae*, vacinadas e desafiadas com

Streptococcus agalactiae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 892-898, 2013.

SANTOS, C.L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R. Effects of dexamethasone administration in vivo on glycaemia, insulinaemia and circulating substrates are dependents of time of treatment . **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 101-110, 2007.

SANTOS, J.P.; LEITE, L.A.C.; BRITO, A.A.; BALIN, C.F.O.; ESCOBRO, L.O.; SANTOS, J.C.; SILVA Z.P. Alterações hematológicas em pacientes com hemoculturas positivas no hospital geral do estado de alagoas. **NewsLab**, n. 119, p. 128-138, 2013.

SARMENTO, A.; MARQUESA, F.; ELLIS, A.E.; AFONSOA, A. Modulation of the activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head-kidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, p. 79–92, 2004.

SARKAR, A.; SAHA, M.; ROY, P. Identification and typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR fingerprinting. **Aquaculture Research and Development**, v. 3, n. 6, 2-4, 2012.

SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; 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**. Macapá: Embrapa Amapá, p. 330-345, 2009..

SCORVO-FILHO, J.D. **A tilápia no Brasil: perspectivas segundo a SEAP/PR**. I Congresso da Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, Vitória-ES, p. 72, 2004.

SECHER, T.; VASSEUR, V.; POISSON, D.M.; MITCHELL, J.A.; CUNHA, F.Q.; ALVES-FILHO, J.S.; RYFFEL, B. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 7855-7864, 2009.

SECOMBES C.J., BIRD S., CUNNINGHAM C., ZOU J. Interleukin-1 in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 335–343, 1999.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and its effects on survival and Hematology of the carp, *Cyprinus carpio*. **Asian Fisheries Science**, v. 17, p. 1633-173, 2004.

SEPPOLA M, LARSEN AN, STEIRO K, ROBERTSEN B, JENSEN I. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1beta, IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Molecular Immunology**, v. 45, p. 887-897, 2008.

SETERNES T, DALMO RA, HOFFMAN J, BOGWALD J, ZYKOVA S, SMEDSROD B. Scavenger receptor mediated endocytosis of lipopolysaccharide in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 4055-4064, 2001.

SHOTTS, E.B.; TSU, T.C.; WALTMAN, W.D. Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. **Fish Pathology**, v. 20, p. 37-40, 1985.

SILVA, F.P.; VELASCO, I.T. **Sepse**. Ed. Manola, São Paulo, 2007.

STENSVAG K, BOGWALD J, SMEDSROD B, JORGENSEN TQ. Distribution of intravenously injected A-layer protein and lipopolysaccharide (LPS) from *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon *Salmo salar*, L. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, p. 591-607, 1999.

SIPAÚBA-TAVARES, L.E.; MORENO, S.Q. Variação dos parâmetros limnológicos em um viveiro de piscicultura nos períodos de seca e chuva.

Revista Unimar, v.16, p. 229-242, 1994.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P.; LIMA, L.C.; VITORINO, R.R.; PEREZ, M.C.A. MENDONÇA, E.G.; OLIVEIRA, M.G.A; GELLER, M. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 23, n2, p. 207-216, 2011.

SIKULER, E.; GUETTA, V.; KEYNAN, A.; NEUMANN, L.; SCHLAEFFER, F. Abnormalities in bilirubin and liver enzyme levels in adult patients with bacteremia. A prospective study. **Archives of Internal Medicine**, v. 149, p. 2246-2248, 1989.

SPEAR, G.T.; JUNE, R.A.; LANDAY, A.L. Oxidative burst capability of human monocyte subsets defined by high and low HLA-DR expression. **Immunological Investigations**, v. 18, p. 993-1005, 1989.

STANLEY, W.C.; GERTZ, E.W.; WISNESKI, J.A.; MORRIS, D.L.; Neese, R.A.; Brooks, G.A. Systemic lactate kinetics during graded exercise in man. **American Journal of Physiology**, v. 249, p. 595-602, 1985.

STAFFORD, J.L.; BELOSEVIC, M. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 539–554, 2003.

STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, p.269-277, 1993.

SUN J., ZHAO L., SUN L. Interleukin-8 of *Cynoglossus semilaevis* is a chemoattractant with immunoregulatory property. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, p. 1362-1367, 2011.

SWAIN P, NAYAK S.K, NANDA P.K, DASH S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 191- 201, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, p. 103-110, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematology in Teleost Fish**. São Paulo: Ribeirão Preto (in Portuguese), 2004.

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

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, p. 709-712, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sangüíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 16, p. 423-431, 1999.

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; T.W. CAMPBELL. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Wiley-Blackwell, 2nd ed. 2012.

TILLEMA, M.S.; LORENZ, K.L.; WEISS, M.G.; DRIES, D.J. Sublethal endotoxemia promotes pulmonary cytokine-induced neutrophil chemoattractant expression and neutrophil recruitment but not over lung injury in neonatal rats.

Biology of Neonates, v. 78, p. 308-14, 2000.

TOSKOPF, M.K. **Fish medicine**, Philadelphia: Saunders, p.269-277, 1993.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneus, 2005.

TRACEY, K.J.; LOWRY, S.F.; CERAMI, A. Cachetin/TNF-alpha in septic shock and septic adult respiratory distress syndrome. **The American review of respiratory disease**, v. 17, p. 1377-9, 1988.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 349-374, 2000.

WANG T., SONG X.H., BAO G.M., ZHAO L.X., YU X., ZHAO J. Molecular characterization, expression analysis, and biological effects of interleukin-8 in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, p. 1421-1432, 2013.

WHYTE, S.K. The innate immune response of finfish e a review of current knowledge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1127–1151, 2007.

UEMATSU S, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, p. 712–25, 2007.

URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarian Medicina**, v. 56, n. 10, p. 486–503, 2011.

VAN DEN BERGHE, G., DE ZEGHER, F., BAXTER, K.R.C.; VELDHUIS, J.D.; WOUTERS, P.; SCHETZ, M.; VERWAEST, C.; VAN DER VORST, E.; LAUWERS, P.; BOUILLON, R.; BOWERS, C.Y. Neuroendocrinology of prolonged critical illness: Effects of exogenous thyrotropin-releasing hormone and its combination with growth hormone secretagogues. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, p. 309-319, 1998.

VERMILLION, S.E.; GREGG, J.A.; BAGGENSTOSS, A.H.; BARTHOLOMEW, L.G. Jaundice associated with bacteremia. **Archives of Internal Medicine**, v. 124, p. 611-618, 1969.

WAKABAYASHI G; GELFAND JÁ; BURKE JF; THOMPSON RC and DINARELLO CA. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia Coli-induced shock in rabbits. **FASEB**, v 5, p. 338-343, 1991.

WEBSTER, J.R.; MOENTER, S.M.; WOODFILL, C.J.I. et al. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season specific suppression of gonadotropin secretion in sheep. **Endocrinology**, v.129, n.1, p.176-183, 1991.

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

WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n.2, p. 340-347, 2002.

ZANETTI G; HEUMANN D; GÉRAIN J; KOHLER J; ABBET P; BARRAS C; LUCAS R; GLAUSER MP and BAUMGARTNER JD. Cytokine production after

intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. **Journal Immunology**, v. 148, p. 1890-1897, 1992.

ZOU J., WANG T., HIRONO I., AOKI T., INAGAWA H., HONDA T., SOMA G.I., OTOTAKE M., NAKANISHI T., ELLIS A.E., SECOMBES C. J. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 161–172, 2002.