

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNOMODULAÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA  
EM TILAPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Ives Charlie da Silva  
Médico Veterinário

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNOMODULAÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA  
EM TILAPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Ives Charlie da Silva

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

**2017**

Charlie-Silva, Ives  
C478i Imunomodulação da ciclofosfamida na reação inflamatória em  
tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Ives Charlie da Silva. --  
Jaboticabal, 2017  
vii, 57p.: il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Marco Antônio de Andrade Belo  
Banca examinadora: Annelise Camplesi, Luciano Melo de Souza,  
Wilson Gomez Manrique, Silas Eto.  
Bibliografia

1. Imunofarmacologia. 2. Peixes teleósteos. 3. Inflamação. I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:639.3.09

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE: IMUNOMODULAÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**AUTOR: IVES CHARLIE DA SILVA**

**ORIENTADOR: MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. WILSON GÓMEZ MANRIQUE

Secretaria do Curso de Medicina / Universidade Federal de Rondônia / Rolim de Moura/RO



Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. LUCIANO MELO DE SOUZA

Parasitologia Veterinária / Universidade Brasil- Descalvado/SP



Pós-doutorando SILAS FERNANDES ETO

Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 09 de dezembro de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

IVES CHARLIE DA SILVA – nascido em Ibaté – SP em 11 de fevereiro de 1988. É médico veterinário, formado em dezembro de 2010, pela Universidade Brasil, campus de Descalvado - SP. Durante a graduação fez estágios em diversas áreas. Foi bolsista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA/Pecuária Sudeste. Em 2011 ingressou no mestrado pela Universidade Estadual Paulista UNESP, Jaboticabal - SP. Em 2014, ingressou no doutorado pela Universidade Estadual Paulista UNESP, Jaboticabal. Em 2016, ingressou no curso de especialização em Farmacologia pela Universidade Federal de Minas Gerais UFMG. Atualmente, participa de projetos de pesquisa e desenvolvimento tecnológico nas áreas de imunofarmacologia de produtos naturais e sintéticos, inflamação e identificação de novas substâncias com atividade farmacológica.

*“A história de um menino pobre, que morava na China, que desejava muito ter um cavalo, mas que não tinha dinheiro”*

*Justamente quando ele estava sentado na calçada do lado de fora da sua casa, passou em sua rua uma cavalaria, que levava um potrinho incapaz de acompanhar o grupo. O dono da tropa, sabendo do desejo do menino, perguntou se ele queria o cavalinho. Exultante, o menino aceitou. Um vizinho, sabendo do ocorrido, disse ao pai do garoto:*

*– Seu filho é de sorte!*

*– Por quê? – perguntou o pai.*

*– Ora – disse ele –, seu filho queria um cavalo, passa uma cavalaria e ele ganha um potrinho! Não é de sorte?*

*– Pode ser sorte ou azar – comentou o pai.*

*O menino cuidou do cavalo com todo zelo, mas um dia, já crescido, o animal fugiu. Desta vez, o vizinho diz:*

*– Seu filho é azarento, hein? Ele ganha um potrinho, cuida dele até a fase adulta, e o potro foge!*

*– Pode ser sorte ou azar – repetiu o pai.*

*O tempo passa e um dia o cavalo volta com uma manada selvagem. O menino, agora um rapaz, consegue cercá-los e fica com todos eles.*

*Observa, então, o vizinho:*

*– Seu filho é mesmo de sorte! Ganha um potrinho, cria, ele foge e volta com um bando de cavalos selvagens.*

*– Pode ser sorte ou azar – responde novamente o pai.*

*Mais tarde, o rapaz estava treinando um dos cavalos, quando cai e quebra a perna.*

*Novamente vem o vizinho:*

*– Seu filho é de azar! O cavalo foge, volta com uma manada selvagem, o garoto vai treinar um deles e quebra a perna.*

*– Pode ser sorte ou azar*

*– insiste o pai. Dias depois, o reino onde moravam declara guerra ao reino vizinho.*

*Os jovens são convocados, menos o rapaz que estava com a perna quebrada. E pela quinta vez, lá vem o vizinho:*

*– Seu filho é de sorte.*

*Assim é na vida, tudo que acontece pode ser sorte ou azar. Depende do que vem depois. O que parece azar num momento, pode ser sorte no futuro.*

***Livro: O Sucesso não ocorre por acaso***

***Dr. Lair Ribeiro***

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, em especial a minha mãe Neusa Maria da Cruz Silva e o meu pai Jose Marcos da Silva que sempre estiveram ao meu lado apoiando, me dando forças e acreditando. Todo o investimento não foi em vão. Foi para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

## AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, pela confiança em mim depositado e no meu trabalho, pela amizade, e por sua orientação nestes anos de trabalho.

Aos professores e pesquisadores que fizeram parte das bancas de qualificação e defesa do doutorado, agradeço pela imensa contribuição na presente tese.

À minha esposa Gisele Cristina Favero à qual em palavras é difícil descrever o quanto sou grato por tudo o que ela me ajudou, ensinou, apoiou e incentivou e pelo companheirismo e amor dedicados a mim.

À Dra. Monica Lopes-Ferreira e Dra. Carla Lima do CeTICS - Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular do Instituto Butanta, agradeço pela imensa contribuição na presente tese.

À professora Dra. Katia Conceição do Laboratório de Bioquímica de Peptídeos, ICT –UNIFESP, agradeço pela colaboração na identificação das proteínas de fase aguda.

À professora Dra. Juliana M. M Gomes e ao professor Dr. Jose Dias do departamento de Morfologia do ICB-UFMG, agradeço pela colaboração na citometria de fluxo.

Ao professor Dr. Andre Klein do Departamento de Farmacologia ICB-UFMG pela disponibilidade e solicitude em sanar minhas dúvidas.

A todos os amigos da UNESP, UFMG e da Rede Zebrafish, pela amizade, carinho, pela ajuda e ensinamentos importantes para a realização desta pesquisa.



À professora Dra. Nathalie Melo pela amizade, disponibilidade e solicitude em sanar minhas dúvidas.

À professora Ingridi Suelen Motta fundadora da página Dicas Diárias de Português, agradeço imensamente pela disponibilidade na correção gramatical desta tese.

**Quem acredita, sempre alcança!**

*Renato Russo*

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I.

1. Considerações gerais .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	02
2.1. A espécie como modelo experimental.....	02
2.2. Inflamação em peixes .....	02
2.3. Ciclofosfamida .....	05
2.4. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	07
3. Referências Bibliográficas.....	08

### *CAPÍTULO II. Artigo: Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model to study sepsis?*

INTRODUCTION.....	13
MATERIAL AND METHODS .....	14
Fish and husbandry.....	14
Induction of Acute inflammation .....	14
Bacterial quantification after infection .....	14
Histopathological assessment.....	14
Swim Bladder Cell Suspension Collection .....	15
Evaluation of blood cells by flow cytometry .....	15
Evaluation of blood cells by flow cytometry .....	15
Cell sorting by flow cytometer and light microscopy .....	15
Image stream .....	16
Reactive Specie Oxygenic (NBT assay) .....	16
Total Protein and albumin concentration .....	16
SDS-PAGE protein electrophoresis .....	16
In-gel protein digestion and mass spectrometric identification.....	17
Statistical analysis .....	17
RESULTS .....	18

DISCUSSION .....	26
REFERENCES .....	30

CAPÍTULO III. Artigo: Ciclofosfamida modula a reação inflamatória aguda e crônica em peixes como modelo experimental

RESUMO .....	35
ABSTRACT .....	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. Comitê de ética.....	38
2.2. Peixes e protocolo experimental.....	38
2.3. Anestesia dos peixes.....	39
2.4. Ensaio I- Modelo de aerocistite aguda .....	39
2.4.1.Avaliação do exsudato inflamatório .....	40
2.4.2. Contagem de leucócitos e trombócitos .....	41
2.4.3. Atividade respiratória dos leucócitos .....	41
2.4.4. Eletroforese das proteínas de fase aguda.....	43
2.5.Experimento II - Inflamação crônica .....	43
2.6. Análise estatística .....	44
3. RESULTADOS .....	44
3.1.Experimento I – Inflamação aguda .....	44
3.1.2. Exsudato inflamatório .....	44
3.1.2 Avaliação dos leucócitos, trombócitos e atividade respiratória de leucócitos .....	44
3.1.3. Avaliação dos leucócitos, trombócitos e atividade respiratória de leucócitos .....	44
3.1.4. Proteínas de fase aguda .....	46
3.1.Experimento II– Inflamação crônica.....	48
3.1.2. Implante de lamínula .....	48
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÃO.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado **“Estudo do efeito imunomodulador da ciclofostamida, ciclosporina e dipirona sódica sobre a resposta inflamatória aguda e crônica de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*”**, protocolo nº 11.860/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	18/08/2016 a 10/08/2017
Espécie / Linhagem	<i>Oreochromis niloticus</i>
Nº de animais	120
Peso / Idade	120g / 3 meses
Sexo	Machos
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.



**Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso**  
Coordenadora – CEUA

## LISTAS DE FIGURAS

Página

### CAPÍTULO I.

**Figura 1** - Estrutura química da ciclofosfamida. .... 06

### CAPÍTULO II.

**Figure 1.** Bacterial infection and leukocytes recruitment. In A, quantification of *A. hydrophila* in blood, caudal kidney and swim bladder. In B, values of total exudate cells. In C, noted exudate cells stained by May–Grünwald–Giemsa–Wright. In D, noted the differential counting of cells from the swim bladder exudate. Different letters mean significantly different by Bonferroni test ( $p < 0.05$ ) ..... 19

**Figure 2.** Light micrographs of the liver and caudal kidney of *O. niloticus*. In A, hepatopancreas section without relevant pathological alterations. In B, note the presence of epithelial detachment of tubular lumen (continuous circle), large obliteration of tubular lumen (arrow), star increased glomerular tuft percula of Bowman capsule (star), hydropic degeneration in tubules (arrowheads), necrosis and inflammatory infiltrate (circle dotted). Bar 50 micrometers..... 20

**Figure 3.** Blood cells of *O. niloticus* separated by FACS Aria and images acquisition by ImageStream and light microscopy. Total blood following by second reading in same cytometer of P2, P3, P4 and P5. P2 – cellular debris; P3 - Portion rich in lymphocytes / thrombocytes; P4 – portion rich in erythrocytes and P5 – portion rich in granulocytes. SSC (side scatter) X FSC (forward scatter)..... 21

**Figure 4.** SDS polyacrylamide gel and densitometry tracing of serum protein in acute inflammatory response in tilapia 6 and 24 hours post-infection... ..... 21

### CAPÍTULO III.

**Figura 1** - Valores médios do número total de leucócitos provenientes de tilápias 6 e 24 horas pós-indução. A análise de variância é representada por letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e letras minúsculas entre os tempos. Letras

diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA + teste post-hoc de Tukey)..... 45

**Figura 2** - Valores médios das contagens de leucócitos (A) trombócitos (B) atividade respiratória dos leucócitos (C) do sangue periférico provenientes de tilápias 6 e 24 horas pós-indução. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de 10 animais em cada grupo. A análise de variância é representada por letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e letras minúsculas entre os tempos. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA + teste post-hoc de Tukey). ..... 46

**Figura 3** - Valores médios das proteínas de fase aguda de tilápias 6 e 24 horas pós-indução. A análise de variância é representada por letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e letras minúsculas entre os tempos. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA + teste post-hoc de Tukey). ..... 47

**Figura 4** - Fotomicrografia de célula gigante multinucleada de Langhans (LGC) e macrófagos (M) e formação de corpo estranho (FBGC) 144 horas após o implante em tilapia do Nilo. Hematoxilina & Eosina. Barra = 10  $\mu$ m ..... 48

**Figura 5** - Valores médios de macrófagos totais (A) e células gigantes (B) 72 e 144 horas pós-implantação. A análise de variância é representada por letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e letras minúsculas entre os tempos. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA + teste post-hoc de Tukey)..... 48

# CAPÍTULO I

---

## 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o aumento da demanda por alimentos e o declínio das reservas naturais de peixes, a produção nacional em cativeiro teve um crescimento exponencial evidente nos últimos anos (VALLADÃO et al., 2016).

A aquicultura brasileira desempenha um importante papel na produção de alimentos e na economia local (FAO, 2014). Segundo um estudo do Instituto Holandês Rabobank, publicado em 2016, o Brasil tem todas as condições necessárias para se tornar uma potência mundial na produção de peixes. Para Halwart et al. (2007) o clima é favorável e a abundância de água, com 6,5 milhões de hectares de reservatórios, lagos e represas é um inestimável potencial produtivo, além de espécies altamente adaptadas aos diferentes sistemas de produção, como a tilápia e o tambaqui, o que coloca o Brasil entre os primeiros em produção no continente americano (VALLADÃO et al., 2016). Em um estudo prospectivo para 2020, tem-se uma previsão de excelente crescimento na produção de peixes no Brasil (RABOBANK, 2016).

A produção de peixes em sistemas intensivos e a biomanipulação dos ecossistemas aquáticos, traz inúmeros desafios, dentre os quais o aumento de espécimes por área e a ocorrência de estresse, decorrente das práticas de manejo, são condições responsáveis por comprometer o sistema imunológico dos organismos aquáticos, predispondo-os às mais diversas enfermidades (BELO et al., 2012), como por exemplo, a ocorrência de infecções por bactérias da espécie *Aeromonas hydrophila*. Os surtos de bacterioses são importantes fatores limitadores da produtividade, pois provocam elevados prejuízos econômicos e altas taxas de mortalidade (MARTINS et al., 2009).

Devido à grande importância econômica que a tilápia-do-Nilo apresenta no mundo todo, a sua escolha como ferramenta de estudo sobre a resposta inflamatória torna-se extremamente necessária, representando um importante modelo experimental para pesquisas com outras espécies de peixes como também para pesquisas e avanços envolvendo doenças em humanos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Tilápia do Nilo**

O gênero Tilápia é muito conhecida pelo seu nome genérico de um grupo de ciclídeos provenientes do continente africano (POPMA; MASSER, 1999). O grande grupo é formado em três gêneros de extrema importância na aquicultura: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilápia*. Assim, espécimes de *Oreochromis* são evidência na aquicultura continental, sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a espécie de maior relevância (POPMA; MASSER, 1999).

Em 1952, a secretaria do estado de São Paulo introduziu no Brasil o primeiro exemplar de tilápia através da importação de *Tilápia rendalli*. Em 1971, o Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) trouxe a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), que apresenta muitas características favoráveis à piscicultura brasileira como o rápido crescimento em sistema intensivo de cultivo, hábito alimentar onívoro e carne com boas características organolépticas. Na natureza, essa espécie consome uma ampla variedade de organismos, incluindo algas, macrófitas e invertebrados aquáticos, larvas de peixes, detritos e matéria orgânica em decomposição (POPMA; MASSER, 1999).

### **2.2. Inflamação em Peixes**

A inflamação é uma reação fisiológica a estímulos nocivos e danos nos tecidos. É frequentemente descrito como uma cascata de eventos coordenados por células imunes em uma tentativa de restaurar a homeostase do tecido (MEDZHITOV, 2008). Este fenômeno é parte essencial das defesas naturais (imunidade inata e adaptativa) do indivíduo, além de apresentar participação efetiva na reparação tecidual (MARTIN; NUNAN, 2015). Pode ser caracterizado como processo agudo ou crônico. Quando é agudo, caracteriza-se com o início imediato, curta duração e manifestação de todos os sinais da inflamação. Se a ação for crônica, não haverá um padrão nem um período determinado e será arquitetado em relação aos mediadores químicos humorais envolvidos.

Em peixes, a agressão tecidual modula a migração celular para o foco inflamatório. As células predominantes durante a resposta inflamatória são constituídas por linfócitos,



granulócitos, macrófagos e trombócitos (CASTRO et al., 2014). Nas primeiras seis horas após os estímulos, observa-se um aumento no acúmulo de granulócitos, como os neutrófilos, responsáveis pela formação da segunda linha de defesa e importantes para a conservação do organismo (LUSTER et al., 2005).

Com o avanço nas pesquisas científicas vários pesquisadores têm utilizado peixes teleósteos transgênicos com leucócitos marcados com proteína verde fluorescente (GFP), permitindo a visualização das imagens de células vivas das respostas inflamatórias e interações hospedeiro-patógeno – antes, inacessíveis à observação direta “*in vivo*” –, revelando insights importantes do comportamento leucocitário (CARRADICE; LIESCHKE, 2008).

Na circulação, dependendo da intensidade e da duração do estímulo, ocorre leucopenia. Os leucócitos que circulam são recrutados para a região agredida por uma série de etapas sequenciais sobrepostas, mediadas por quimiocinas e integrinas (LUSTER, 2005). Recentes pesquisas têm demonstrado que, após a lesão do tecido, há uma indução na resposta inflamatória intensa, caracterizada por quimiotaxia rápida dos neutrófilos no local da ferida. A utilização de peixes teleósteos com neutrófilos GFP, com imagem em tempo real *in vivo*, mostra que os neutrófilos em uma quimiotaxia retrógrada voltam ao interior do lúmen vascular, fato esse somente possível com larvas de peixes que são transparentes (MATHIAS et al., 2006). No entanto, estudos recentes tem demonstraram que os neutrófilos podem afetar o sistema imunológico adaptativo e regular a inflamação sistêmica em caminhos anteriormente não estudados, criando possibilidades intrigantes para os papéis dos neutrófilos migrados de forma reversa (STARNES; HUTTENLOCHER, 2012).

Após a lesão tecidual, as células inflamatórias (neutrófilos e monócitos/macrófagos) secretam citocinas IL-1, IL-6, e TNF- $\alpha$  (Figura 1) na corrente sanguínea, estimulando os hepatócitos a produzirem proteínas envolvidas diretamente nos mecanismos de defesa do organismo. Essas proteínas são conhecidas como proteínas de fase aguda (APPs) e os seus níveis no plasma são modulados rapidamente no início da inflamação (SUVRA et al., 2017). De 12 a 24 horas ocorre o pico de APPs após o início da reação inflamatória.

Neste contexto, há evidências cada vez maiores de que os componentes da resposta de APPs contribuem para a defesa do hospedeiro em doenças infecciosas (CONRADA et al., 2016). Atuando como parte do sistema imune inato, o aumento de APPs “positivas” auxilia na

destruição ou inibição do crescimento de microrganismos, como por exemplo a proteína C reactiva, fatores do sistema complemento, ferritina, ceruloplasmina, haptoglobina, alfa-2-macroglobulina, entre outras. Já com relação às APPs "negativas", ocorre uma diminuição na inflamação, tais como albumina, transferrina, transtiretina, antitrombina e transcortina (GABAY; KUSHNER, 1999).

Inúmeras evidências apontam que as proteínas de fase aguda (APPs) contribuem para a defesa do hospedeiro (CONRADA et al., 2016) agindo como uma ferramenta do sistema inato e, assim, proporcionando um aumento nas “APPs positivas” durante o processo inflamatório. As APPs positivas, como a proteína C reactiva, fatores do sistema complemento, ferritina, ceruloplasmina, haptoglobina e alfa-2-macroglobulina, auxiliam o organismo no combate à infecção e na destruição ou inibição do crescimento de microrganismos. As APPs "negativas", são reduzidas durante o processo inflamatório e as mais conhecidas são: albumina, transferrina, transtiretina, antitrombina e transcortina (GABAY; KUSHNER, 1999).

Ao comparar a resposta de proteína de fase aguda em peixes teleósteos durante o processo inflamatório com a resposta em mamíferos, observam-se semelhanças impressionantes e diferenças óbvias. As APPs denominadas proteína SAA, hepcidina e haptoglobina apresentam similaridade com os mamíferos. O mecanismo de indução de APPs que envolviam as citocinas pró-inflamatórias se manifestam de modo similar, implicando mecanismos evolutivos conservados entre peixes e mamíferos (LIN et al., 2007). Entretanto, os mesmos autores sugerem diferentes estratégias imunológicas adotadas pelos peixes, como o aumento na expressão do gene LECT2.

Forn-Cuní et al. (2017) reportaram que a resposta inflamatória de peixes teleósteos (zebrafish) é capaz de reproduzir o processo inflamatório de um mamífero. Os autores evidenciaram que as vias de sinalização imune e a expressão dos genes estão bem conservadas ao longo da evolução e que as respostas genômicas dos peixes e de mamíferos estão altamente correlacionadas com impacto translacional. No entanto, segundo Steinke et al. (2006) e Brunet et al. (2006), há diferenças perceptíveis entre o mamífero e as respostas imunes de alguns peixes teleósteos, devido à divergência evolutiva, adaptação ao patógeno, evolução e duplicação de genes. Neste contexto, em mamíferos está conservada a susceptibilidade ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), que é rotineiramente usado para

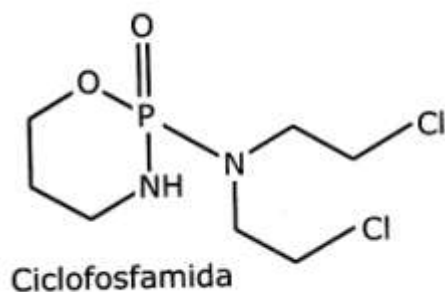
induzir inflamação aguda (COPELAND et al., 2005). Todavia, em zebrafish, o complexo receptor toll-like (TLR) e, especificamente suas funções, não foram conservadas durante o processo evolutivo (ILIEV et al., 2005).

Sullivan et al. (2009) e Sepulcre et al. (2009) reportaram a primeira evidência da evolução funcional da família dos receptores TLR. Os autores descreveram que alguns peixes possuem receptores TLR (tlr4ba e tlr4bb), porém os mesmos não são capazes de reconhecer o LPS, o reconhecimento padrão do LPS ainda precisa ser bem elucidado, no entanto, alguns autores sugerem que a sinalização é via myD88 (SEPULCRE et al., 2009; SULLIVAN et al., 2009). Van der sar et al. (2006) demonstraram pela primeira vez que a resposta imune inata do embrião de zebrafish envolve a sinalização dependente de MyD88.

Outro exemplo de divergência está relacionado com a pressão evolutiva positiva sobre o gene C3 (FORN-CUNÍ et al., 2014). Os genes C3 apresentaram uma habilidade distinta para regular a migração de neutrófilos em resposta às lesões e podem desempenhar um papel na manutenção do equilíbrio entre os processos inflamatórios e homeostáticos em peixes (FORN-CUNÍ et al., 2014). A maioria dos autores se baseia na homologia genética e não na caracterização funcional de estruturas ou órgãos para validar o uso de peixes como modelo experimental.

### **2.3. Ciclofosfamida**

É o medicamento de eleição na medicina veterinária para tratamento de neoplasias. A ciclofosfamida pertence ao grupo químico dos alquilantes, chamados assim por perderem um radical (alquil) e por atuarem independentemente a partir da fase do ciclo celular. Sua ação está dirigida ao DNA. Após ingestão oral, a ciclofosfamida é metabolizada no fígado pela enzima do citocromo P-450 e produz um composto chamado de aldofosfamida. Mais da metade da ciclofosfamida é eliminada na urina em um metabólito inativo. O seu efeito mielotóxico é grave.



**Figura 1.** Estrutura química da ciclofosfamida.

Devido aos contínuos avanços em ciências biomédicas, os medicamentos imunossupressores estão sendo muito utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária para tratamento de diferentes formas de câncer e doenças autoimunes (WÓJCIK; DABKOWSKA, 2010; MULLINS; ALEXANDER, 2017; SEKIGUCHI et al., 2017). Nos últimos anos, a CYP tem sido muito empregada como agente imunossupressor na prevenção da rejeição de enxerto e órgãos, além do tratamento de distúrbios autoimunes crônicos, como artrite reumatóide, esclerose múltipla e lúpus eritromatoso (GHOBADI et al., 2017). Além disso, tem sido utilizada como moduladora das células T com o objetivo de aumentar a eficácia das terapias imunes adaptativa (MULLINS; ALEXANDER, 2017). Segundo o estudo de Yunyun et al. (2017), os efeitos da CYP podem ser potencializados quando combinados com glicocorticoide. Em humanos, a dose de ciclofosfamida é de aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup> (BONONI et al., 2009). Em cães, a dose convencional utilizada em protocolos quimioterápicos é de 200 a 300 mg/m<sup>2</sup> em média.

Kumari e Sahoo (2005), conduziram um estudo para avaliar a imunidade de uma espécie de bagre asiático (*Batrachus clarias*) que recebeu ciclofosfamida na dose (200 mg kg<sup>-1</sup>). Foram avaliados os parâmetros de mieloperoxidase, hematócrito e proteína total, lisozima e atividade do sistema, complemento em que se observou uma expressiva diminuição (P <0,05) na atividade de mieloperoxidase e um potente efeito imunossupressor da ciclofosfamida em peixes *Batrachus clarias*.

De acordo com pesquisa realizada, comparando-se os efeitos mutagênicos da ciclofosfamida, da mitomicina C, da deltametrina e o do glifosato em tilápias (*Tilapia*

*rendalli*) e ratos, foram observados efeitos mutagênicos semelhantes da ciclofosfamida e mitomicina C em ambas as espécies. Entretanto, a deltametrina e o glifosato apresentaram efeitos mutagênicos negativos em ratos, enquanto que na *Tilápia rendalli* esses efeitos foram positivos (GLISOLIA, 2002).

Segundo Palhares e Grisolia (2002), em um estudo mutagênico sobre *Tilápia rendalli* e *Oreochromis niloticus* utilizando ciclofosfamida ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ou mitomicina C ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) em doses únicas, houve diferentes respostas para as duas espécies avaliadas, enquanto a *T. rendalli* produziu um número expressivo de eritrócitos com núcleos deformados, essas respostas não foram encontradas em *O. niloticus*.

Duas substâncias foram testadas, a fim de determinar quais seriam as mais adequadas para uso como controle positivo em estudos mutagênicos em *Astyanax bimaculatus*. A ciclofosfamida ( $16 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e o sulfato de vimblastina ( $8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foram as mais eficazes em causar micronúcleos. A ciclofosfamida, por ser considerada a substância mais mutagênica, foi recomendada para uso como um controle positivo em *A. bimaculatus* (MATSUMOTO; CÓLUS, 2000).

#### 2.4. *Aeromonas hydrophila*

O gênero *Aeromonas*, Gram negativas, são encontradas no mundo inteiro, frequentemente em fontes naturais de água, no solo e em animais de água doce (DAVIS et al., 1990). Esse gênero possui flagelos polares e não produz esporos e não são encapsuladas, e sua respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa (STOSKOPF, 1993). Apresenta lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa, o qual é descrito como potente quimiotático para neutrófilos e causa do choque séptico (FREUNDENBERG et al., 1984).

A doença é transmitida horizontalmente a partir das excretas dos peixes ou lesões da pele (AOKI, 1999), causada pelo complexo *Aeromonas* e se apresenta como septicemia hemorrágica, exibindo quadro congestivo-hemorrágico generalizado, úlceras e abscessos cutâneos com posterior perda do epitélio, exoftalmia, ascite, anemia e morte (AUSTIN; AUSTIN, 1987; NOGA, 1995). A aeromonose apresenta diferenças de acordo com a espécie de teleosteo acometida. Wedemeyer et al. (1968), observaram que *O. kisutch* e *O. mykiss*, são resistentes a *A. salmonicida* em inóculos de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$ . Os peixes são menos sensíveis que os

mamíferos ao LPS e essa resistência é atribuída à menor habilidade dos macrófagos em produzir IL-1 e TNF- $\alpha$  e possuem menor quantidade de receptores para o complexo LPS (SWAIN et al., 2008).

### 3. REFERÊNCIAS

BELO, M. A. D. A.; MORAES, J. R. E. D.; SOARES, V. E.; MARTINS, M. L.; BRUM, C. D.; MORAES, F. R. D. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 7, p. 1015-1021, 2012.

BONONI, A.; LANZA, F.; FERRARI, L.; GUSELLA, M.; GILLI, G.; ABBASCIANO, V.; CAMPIONI, D.; RUSSO, A.; MENON, D.; ALBERTINI, F.; STIEVANO, L.; BARILE, C.; CREPALDI, G.; TOSO, S.; FERRAZZI, E.; PASINI, F. Predictive value of hematological and phenotypical parameters on postchemotherapy leukocyte recovery. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 76, n. 5, p. 328-333, 2009.

DE CASTRO, M. P.; CLAUDIANO, G. S.; BORTOLUZZI, N. L.; GARRIDO, E.; FUJIMOTO, R. Y.; BELO, M. A. A.; ... MORAES, F. R. Chromium carbochelate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. **Aquaculture**, p. 432, 114-118. (2014).

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

FAO, 2014. Relatório Annual. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014 (SOFIA) 243 p. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/097d8007-49a4-4d65-88cd-fcaf6a969776/>

GHOBADI, E.; MOLOUDIZARGARI, M.; ASGHARI, M. H.; ABDOLLAHI, M. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, 13(5), 525-536. (2017).

HALWART, M.; SOTO, D.; ARTHUR, J. R. Cage aquaculture: regional reviews and global overview. **FAO Fisheries Technical Paper**, 498: 259p. 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 454(7203), 428. (2008).

MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, 173(2), 370-378. (2015).

MARTINS, M. L.; VIEIRA, F. N.; JERÔNIMO, G. T.; MOURINO, J. L.; DOTTA, G.; SPECK, G. M.; ... Pereira, G. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Fish physiology and biochemistry*, 35(1), 219, (2009).

MULLINS, D. W.; ALEXANDER, M. P. Cyclophosphamide preconditioning facilitates autoimmune vitiligo and enhanced antitumor efficacy following vaccination with activated dendritic cells. *The Journal Immunology*. 198 (1 Supplement) 204.12. (2017).

POPMA, T.; MASSER, L. *Tilapia. Life History and Biology*. Southern Regional Aquaculture Center (1999), publication no. 283

RABOBANK REPORT: Brazil is a seafood industry giant in the making. 12 February 2016. Disponível em: <https://www.undercurrentnews.com/2016/08/15/raboba> Acesso em: setembro de 2017.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. *Rev Aquacult*, v. 1, p. 1-19, 2016.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England journal of medicine*, 340(6), 448-454. (1999).

WÓJCIK, R.; DABKOWSKA, A. The effect of cyclophosphamide on the selected parameters of immunity in rats. ***Central European Journal of Immunology***, 35, 1-9. (2010).

SEKIGUCHI, N.; NISHINA, S.; KAWAKAMI, T.; SAKAI, H.; SENOO, N.; SENOO, Y.; ISHIDA, F. Oral cyclophosphamide was effective for Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia in CD16+ CD56- chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells. ***International journal of hematology***, 105(6), 854-858, 2017.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature immunology*, 6(12), 1182-1190. Carradice, D., & Lieschke, G. J. (2008). Zebrafish in hematology: sushi or science?. *Blood*, 111(7), 3331-3342, 2005.

MATHIAS, J. R.; PERRIN, B. J.; TING-XI, L; KANKI, J.; LOOK, A. T.; HUTTENLOCHER, A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish, December 2006 *Journal of Leukocyte Biology* vol. 80 no. 6 1281-1288

TAYLOR, W.; STARNES,; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil Reverse Migration Becomes Transparent with Zebrafish *Advances in Hematology* Volume 2012 (2012), Article ID 398640, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2012/398640>

ROY, S.; KUMAR, V.; KUMAR, V.; BEHERA, B. K. Acute phase proteins and their potential role as an indicator for fish health and in diagnosis of fish diseases. **Protein and Peptide Letters**, v. 24, n. 1, p. 78-89, 2017.

CONRAD, D. M.; HOSKIN, D. W.; LIWSKI, R.; NAUGLER, C. A re-examination of the role of the acute phase protein response in innate cancer defence. **Medical Hypotheses**, London, v. 93, p. 93-96, 2016.

LIN, B.; CHEN, S.; CAO, Z.; LIN, Y.; MO, D.; ZHANG, H. U, A. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 4, p. 295-301, 2007.

FORN-CUNÍ, G.; VARELA, M.; PEREIRO, P.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 1-9, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291205/pdf/srep41905.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2018.



# CAPÍTULO II

---

## **Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model to study sepsis?**

Ives Charlie-Silva<sup>1</sup>; Andre Klein<sup>2</sup>, Juliana Moreira Mendonça Gomes<sup>3</sup>; Ed Johnny da Rosa Prado<sup>1,4</sup>; Alessandra Cristina de Moraes<sup>1,4</sup>; José Jurandir Fagliari<sup>5</sup>; José Dias Corrêa Junior<sup>3</sup>; Dayanne Carla Fernandes<sup>6</sup>; Silas Fernandes Eto<sup>7</sup>; Wilson Gómez Manrique<sup>8</sup>; Katia Conceição<sup>9</sup>; Mônica Lopes-Ferreira<sup>10</sup>; Carla Lima<sup>10</sup>; Marco Antonio de Andrade Belo<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>PhD Program in Veterinary Medicine, School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal-SP, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of Inflammation and Pain, Department of Pharmacology, ICB-UFMG, Belo Horizonte-MG, Brazil. <sup>3</sup>Department of Morphology, ICB-UFMG, Belo Horizonte-MG, Brazil. <sup>4</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Brazil. <sup>5</sup>Department of Clinical and Surgery, School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP). <sup>6</sup>Institute of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, São Paulo, SP – Brazil. <sup>7</sup>Department of Technology, School of Agrarian and Veterinary Sciences, São Paulo State University, São Paulo – Brazil. <sup>8</sup>Department of Technology, Federal University of Rondônia - Rolim de Moura Campus. <sup>9</sup>Laboratory of Peptide Biochemistry, ICT -UNIFESP, São José dos Campos, Brazil. <sup>10</sup>Immunoregulation Unit of the Special Laboratory of Applied Toxinology (CEPID/FAPESP), Butantan Institute, São Paulo, Brazil.

This work was supported by the São Paulo Research Foundation -FAPESP and CNPq.

“No potential conflict of interest was reported by the authors.”

\*Corresponding author: Dr. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n Zip code: 14884-900- Jaboticabal, SP

E-mail: [maabelo@hotmail.com](mailto:maabelo@hotmail.com)

## ABSTRACT

Based on the importance of establishing new experimental models and the advantages of using teleost fish to study the pathophysiology of the inflammatory reaction, the present investigation evaluated the modulation of serum levels of acute phase proteins (APPs) after inoculation of *Aeromonas hydrophila* into the swim bladder. Material and Methods: 40 tilapias, *Oreochromis niloticus* ( $240.0 \pm 10.2$  g) were randomly divided into four aquariums with 250 L of water ( $n = 10$ ), to establish two treatments: inoculated with *A. hydrophila* and inoculated with saline, to be sampled 6 and 24 hours post-inoculation (HPI) for blood collection and flow cytometry and determination of the electrophoretic fractionation of the APPs (SDS-PAGE), in-gel protein digestion and mass spectrometric identification. Results: Electrophoretic traces of 30 protein fractions were found by computerized densitometry whose molecular weights ranged from 22 to 200 kDa. By LC-MS/MS analysis, proteins including ceruloplasmin, complement C3,  $\alpha 2$  macroglobulin, albumin, transferrin, haptoglobin, apolipoprotein A1, complement C3 isoform X1, complement factor 3 and apolipoprotein Eb were identified. Similarly, to mammals, tilapia inoculated with *A. hydrophila* showed decrease ( $P < 0.05$ ) in the amount of albumin and transferrin when compared to control animals 6 and 24 HPI, as well as, presented increase ( $P < 0.05$ ) of ceruloplasmin, Alpha2 macroglobulin and C3 complement. The response profile of APPs in tilapia during the infectious disease resembles that observed in mammals, demonstrating the potential of this experimental model.

## INTRODUCTION

Inflammation is a defense mechanism of the body in response to noxious stimuli, and is an essential component of normal tissue homeostasis (Medzhitov, 2008). After tissue injury, inflammatory cells such as neutrophils, monocytes and macrophages secrete cytokines into the bloodstream, stimulating hepatocytes to produce proteins which are directly involved in the body's defense mechanisms. These are known as acute phase proteins (APPs) and their plasma levels are modulated rapidly at the onset of inflammation (Suvra et al., 2017). High levels of APPs has been associated with numerous diseases, such as type 2 diabetes (Donath & Shoelson, 2011), Alzheimer's disease (Varma et al., 2017), Parkinson's disease (Guo et al., 2016), cancer (Lindner et al., 2010; Thieme et al., 2015) and cases of bacterial infection (Prachi et al., 2015). In addition, there are some emerging evidences to the role of APPs to the development of inflammation in infectious diseases (Conrada et al., 2016). By acting as part of the innate immune system, the increase of "positive" APPs, such as C-reactive protein, complement system factors, ferritin, ceruloplasmin, haptoglobin and alpha-2-macroglobulin, among others, assists in the destruction or inhibition of the growth of microorganisms. Meanwhile "negative" APPs such as albumin, transferrin, transthyretin, antithrombin and transcortin decrease during inflammation (Gabay & Kushner, 1999). Teleost fish have demonstrated several advantages over other animal species and may act as an alternative to the use of rodents or to provide complementary information when used as a model for disease studies or as a tool aiming the prospecting for new drugs, among other uses (Tavares & Santos Lopes, 2013). For decades, classical experimental models in mammals have been used to study the evolution of inflammatory response in either the acute or the chronic phase. The aerocystitis model, which mimics the pleurisy technique in rodents, has been shown to be extremely effective to the study of acute inflammation in teleost fish, as the swim bladder is a delimited cavity organ with terminal circulation and allows easy access for the inoculation of phlogogens and the collection of exudates for the evaluation of cellular components and fluids accumulated in the inflammatory focus (Claudiano et al., 2013; Castro et al., 2014). Based on the importance to the establishing of new experimental models and on the advantages of the use of teleost fish as a model to the study of the pathophysiology of inflammatory reaction, as the main endogenous glucocorticoid of fish is cortisol, which is similar to humans (Belo et al., 2005; 2012a), the present investigation evaluated the modulation of the serum levels of APPs and blood leukocytes following the inoculation of *Aeromonas hydrophila* into the swim bladder of Nile tilapia fishes.

## MATERIAL AND METHODS

### *Fish and husbandry*

Once collected, Nile tilapia (*O. niloticus*) weight of 140 g (SD  $\pm$  10.260 g) were transported back to São Paulo State University in aerated coolers where they were acclimated for two weeks in tanks (250 L) in ambient of clean water (dissolved oxygen =  $5.0 \pm 0.7$  mg/L; temperature =  $27.25 \pm 1.0$  °C; pH =  $7.50 \pm 0.5$ ; and conductivity =  $114.81 \pm 11.5$   $\mu$ S/cm measured with a YSI MPS 556 probe). Fish were fed with commercial feed (3% biomass, 28% GP and 4000 kcal of GE kg<sup>-1</sup>). This study was approved by the Ethics Committee for Use of Animals (CEUA) of São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal campus (no. 11.860/16).

### *Induction of Acute inflammation*

After the initial acclimation period, fish were placed into different experimental treatment tanks ( $n = 10$  per tank) in order to assess the response to *Aeromonas hydrophila* isolated on Preventive Veterinary Medicine Department from Unesp/Brazil. First they were anesthetized by immersion in aqueous solution of 1/10,000 benzocaine (Sigma-Aldrich Laboratory, Steinheim, Germany), and 0.1 mL of the *A. hydrophila* solution were inoculated for each 30 g of fish body weight in the swim bladder. After 6 or 24 hours, fish were killed by immersion in benzocaine solution (1/500) and clinical signs and growth of bacteria were assessed and blood, kidney, swim bladder, and cells from swim bladder were collected.

### *Bacterial quantification after infection*

The bacterial quantification assay was performed according to Li et al. (2014). The caudal kidney homogenized in 10 mg/mL sterile PBS (pH 7.2), the swim bladder diluted (1:10) in sterile PBS, and 25  $\mu$ l of whole blood were all incubated for 18 h at 28 °C in plates containing TSA medium with ampicillin (10 mg/L), when the bacterial colonies were counted separately in a colonies counter. Each sample was seeded in triplicate and the results were expressed in CFU per mm<sup>2</sup>.

### *Histopathological assessment*

H&E-stained liver and kidneys sections (5  $\mu$ m) of fish receiving injection of *Aeromonas hydrophila* were examined light-microscopically with a Zeiss Axiophot microscope (Zeiss,

Oberkochen, Germany) at magnifications between  $\times 100$  for the accumulation of recruited leukocytes.

#### *Swim Bladder Cell Suspension Collection*

Swim Bladder exudates were harvested with 2 x 0.5 ml of cold PBS + 10 mM EDTA for cell suspensions that were centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4°C. The supernatants were stored at -20°C; and cell pellets were resuspended in 1 ml of PBS + tilapia serum (Suzuki, 1986). The total leukocyte count was performed in a Neubauer chamber with May–Grünwald–Giemsa–Wright (MGGW) method.

#### *Evaluation of blood cells by flow cytometry*

For differential cell counts, aliquots of blood cells (25  $\mu$ l) were incubated for 15 minutes with 3  $\mu$ l of propidium iodide at 50  $\mu$ g/ml (PI – Sigma, St Louis) in the dark. The samples were resuspended in 1 mL of PBS and immediately analyzed by flow cytometry (FACScan - Becton Dickinson) using side/forward scatter characteristics and PI exclusion. Data (100,000 cells) from stained samples were acquired using a four-color FACsCalibur flow cytometer equipped with FlowJo software (Becton-Dickinson, San Jose, CA) at the UFMG cytometer facility. Data were recorded as percent of fluorescent positive cells or absolute number per cavity.

#### *Cell sorting by flow cytometer and light microscopy*

All analyzes of Cell sorting and Image stream were performed at the René Rachou Institute - Fiocruz Minas, Brazil. Blood samples were previously diluted (20 x) in phosphate-buffered saline containing 5% bovine serum albumin (BSA). Each sample was filtered in a cell strainer (40  $\mu$ m - BD) and their populations were separated in different vials using a flow cytometer (BD-FACSAria III) according to Inoue et al., (2002) and Traver et al., (2003). A minimal of 100,000 cells were carried out for each sample and cell separation was performed based on data from Witten et al., (1998) and Gomes et al., (2015). For morphological classification, aliquots containing 100  $\mu$ l of cell suspension were applied on glass slides, subjected to centrifugation at 1000 rpm for 10 min and stained Cytospin with May–Grünwald–Giemsa–Wright and analyzed in an optical microscope (Olympus BX41 light microscope) with a 100 x objective.

### *Image stream*

Images of the vials sample sorted by BD-FACSAria were performed in Image Stream®X Mk II – AMNIS cytometer. The acquisitions were carried out in bright field mode by using 40 x objective. This equipment can acquire images of 2,000 cells per second using a field of view of 60 x 128µm and obtains images with a pixel size of 0.5 µm.

### *Reactive Specie Oxygenic (NBT assay)*

Five hundred micro liters of blood in 15 µl of heparin (5.000 IU mL<sup>-1</sup>) were collected from the caudal vein for the nitro blue tetrazolium (NBT) assay. The respiratory burst of leukocytes was measured according to Park and Choi (2014), with some modifications. Briefly, 100 µL of heparinized blood was mixed with 100 µl of NBT (0.2% w/v PBS – Sigma, St. Louis, MO, USA). The solution was homogenized and incubated in a dark room for 30 min at 25 °C. After incubation, 50 µl of the solution was added in 5 mL tubes containing 1 mL of n,n-dimethylformamide (DMF, Sigma, St. Louis, MO, USA) and centrifuged at 3000 x g for 5 min. The optical density of the supernatant was measured using a spectrophotometer with optical density of 540 nm.

### *Total Protein and albumin concentration*

Blood fish samples were collected by puncture of the caudal vessel ant then placed in 2.0 mL microtubes, without anticoagulant, and centrifuged at 3000 g for 10 minutes at 4 ° C. The separated serum was used to determine the total protein and albumin concentrations in a spectrophotometer with Kit Labtest (Belo et al., 2012).

### *SDS-PAGE protein electrophoresis*

After 6 and 24 h, protein content in the blood samples was assessed by means of electrophoretic fractioning in a vertical system using the SDS-PAGE 10% method, with the gel prepared as described by Laemmli (1970). Molecular weight and protein fraction levels were determined using readings from a computerized densitometer (Shimadzu CS-9301, Tokyo, Japan). This analysis was performed in Department of Clinical and Surgery, São Paulo State University (UNESP). To identify the protein content, different markers of molecular weights, ranging from 20 to 200 kDa were used.

### *In-gel protein digestion and mass spectrometric identification*

Protein bands were excised from the SDS-polyacrylamide and in-gel trypsin digestion was performed according to Niessen et al. (2006) in Laboratory of Peptide Biochemistry, ICT - UNIFESP, São José dos Campos, Brazil and Laboratory. Mass spectrometric analysis by LC-MS/MS in Immuno Regulation at Unit Butantan Institute, São Paulo, SP – Brazil. Peptide samples (4.5 µl) were automatically injected into a trap column packed with C18 (180 µm id x 20 mm) (Waters, Milford, MA) for desalting with 100% solvent A (0.1% formic acid) at 15 µL/min for 3 min. Peptides were then eluted onto an analytical C18 column (100 µm id x 100 mm) (Waters, Milford, MA) using a 20 min gradient at a flow rate of 600 nL/min where solvent A was 0.1% formic acid and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile. The gradient was 0–3% of solvent B in 1 min, 3–60% B in 14 min, 60–80%B in 2.5 min, 80%B for 1 min, then back to 3%B in 1.5 min. An ESI Q-TOF Ultima mass spectrometer (Waters, Milford, MA) was used to acquire spectra. Spray voltage and temperature were set at 3.4 kV and 100 °C, respectively, and the instrument was operated in data dependent mode, in which one full MS scan was acquired in the m/z range of 200–2000 followed by MS/MS acquisition using collision induced dissociation of the three most intense ions from the MS scan. Dynamic peak exclusion was applied to avoid the same m/z to be selected for the next 45 s. Raw data files of fragment spectra were processed by ProteinLynx 2.2 (Waters, Milford, MA) and converted to \*.pkl format. The resulting fragment spectra were searched using Mascot (version 2.4.1) search engine (Matrix Science, UK) against the UniProt and NCBI nr database restricted to Actinopterygii Class with a parent tolerance of 1.5 Da and fragment tolerance of 1.0 Da. Iodoacetamide derivative of cysteine and oxidation of methionine were specified in Mascot as fixed and variable modifications, respectively. Mascot identifications required ion scores greater than the associated identity scores and 20, 30, 40 and 40 for singly, doubly, triply, and quadruply charged peptides, respectively.

### *Statistical analysis*

The data experiments were confirmed by the Shapiro-Wilk test, and subjected to analysis of variance by a split-plot design with subunit in time, using the Core Team R version 7 program. The data are represented as mean ± standard error, and were used to evaluate differences between all the controls and fish injected with *A. hydrophila* according to time.  $p < 0.05$  was considered significant by the Bonferroni test.

## RESULTS

### *Bacterial quantification assay*

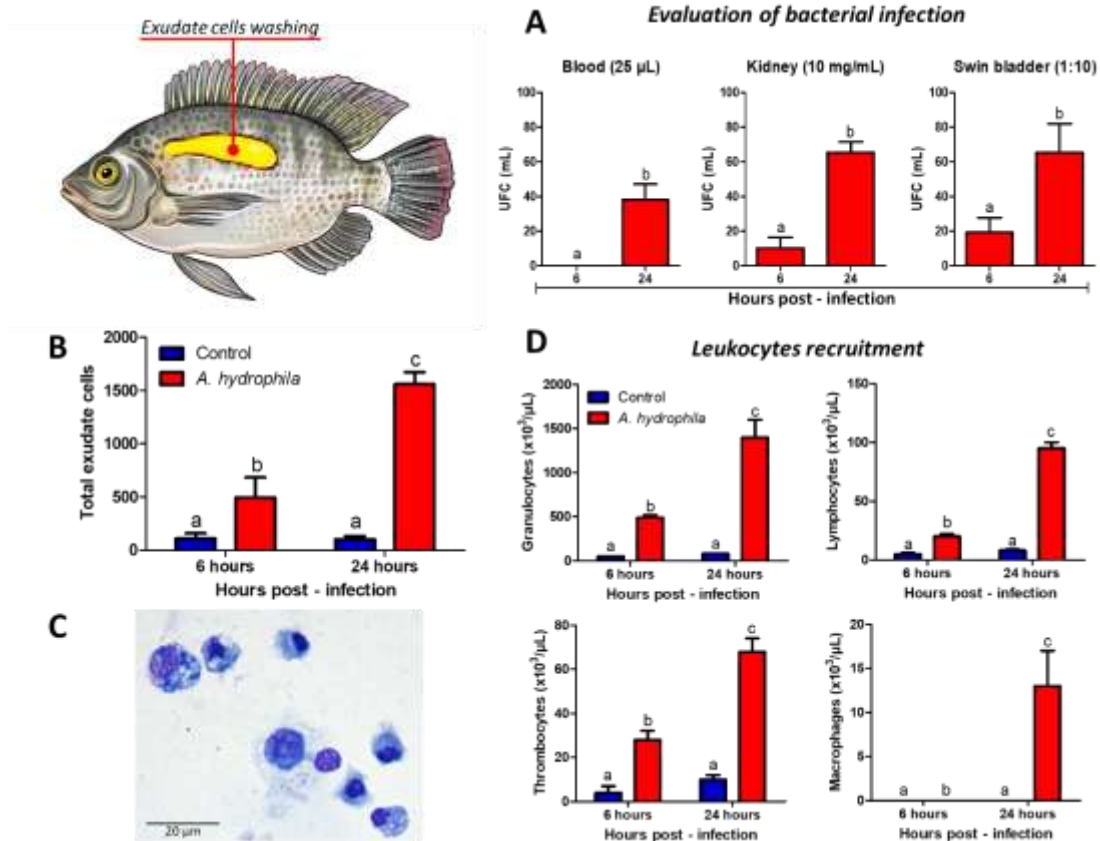
The quantitative results of the bacterium in the blood, caudal kidney and swim bladder for *A. hydrophila* are shown in Figure 1A. The data showed that the model of swim bladder administration allowed bacterial dissemination through the blood and caudal kidney, resulting in pathological changes in renal tissue. The bacterial count of the caudal kidney every 10 mg / mL and the 10-fold diluted swim bladder were significantly increased ( $p < 0.05$ ) at times of 6 and 24 HPI. However, no bacterial growth was observed in 25  $\mu$ L sample of 6 HPI blood, and a significant increase ( $p < 0.05$ ) 24 HPI.

### *Exudate*

The accumulated total cell count in the exudate showed a significant increase over time ( $p < 0.05$ ) in fish with infectious stimuli, with granulocytes being the most present cell types accumulated in the inflamed spot (Figure 1B and 1C). In the control animals inoculated with saline no significant variations were observed in the cellular accumulation present in the swim bladder (Figure 1B).

Differential cell counts revealed a significant increasing in the number of lymphocytes, macrophages, granulocytes and thrombocytes in tilapia with infectious aerocystitis when compared to control animals inoculated with saline (Figure 1D). The study of the evolution of the inflammatory reaction showed a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the accumulation of granulocytes, thrombocytes, lymphocytes and macrophages accumulated in the exudate of fish inoculated with *A. hydrophila* between 6 and 24 HPI (Figure 4). Saline-inoculated control fish did not show significant variations ( $p > 0.05$ ) in cell counts between the periods analyzed (Figure 1D).

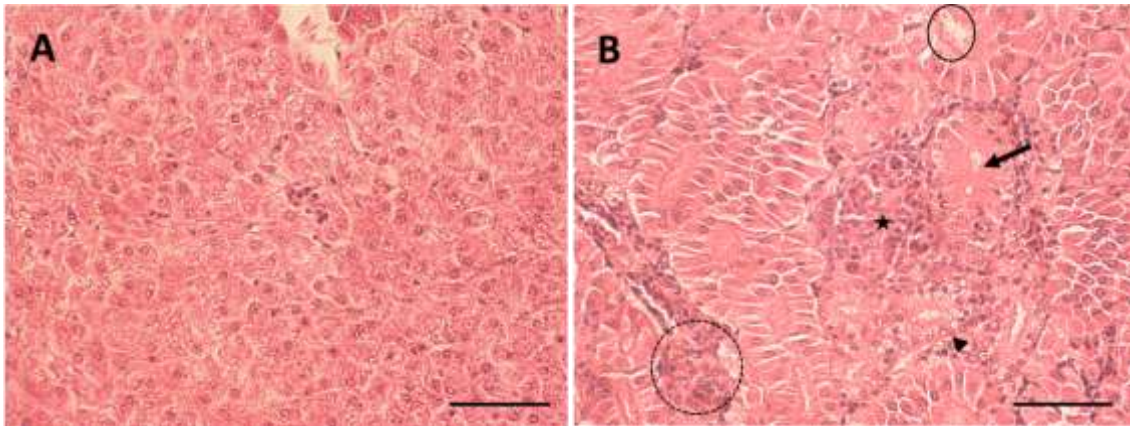




**Figure 1. Bacterial infection and leukocytes recruitment.** In A, quantification of *A. hydrophila* in blood, caudal kidney and swim bladder. In B, values of total exudate cells. In C, noted exudate cells stained by May–Grünwald–Giemsa–Wright. In D, noted the differential counting of cells from the swim bladder exudate. Different letters mean significantly different by Bonferroni test ( $p < 0.05$ ).

#### Histopathological assessment

Histopathological changes in caudal kidney of *O. niloticus* were observed in fish inoculated with *A. hydrophila*. The hepatopancreas did not exhibit substantial differences. The most relevant alterations found in caudal kidney were epithelial detachment of tubular lumen (Continuous circle), obliteration of tubular lumen (arrow large), increased glomerular tuft percola of capsule de.Bowman (star), hydropic degeneration in tubules (arrowhead), necrosis and inflammatory infiltrate (circle dotted).



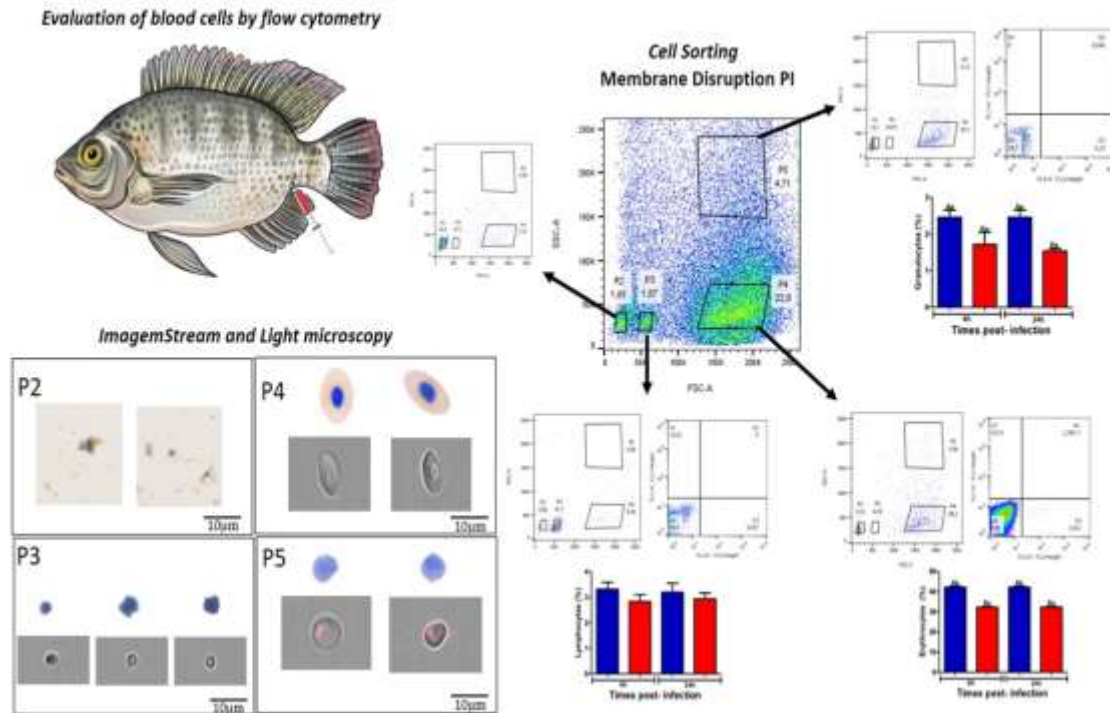
**Figure 2. Light micrographs of the liver and caudal kidney of *O. niloticus*.** In A, hepatopancreas section without relevant pathological alterations. In B, note the presence of epithelial detachment of tubular lumen (continuous circle), large obliteration of tubular lumen (arrow), star increased glomerular tuft percula of Bowman capsule (star), hydropic degeneration in tubules (arrowheads), necrosis and inflammatory infiltrate (circle dotted). Bar 50 micrometers.

#### *Blood cells and Oxidative Burst*

Total blood cells were quantified by cell sorting using FACS method. Figure 3 shows the blood cells distribution profile in the flow cytometry graphs and their relative frequencies of each population. Four populations (P2, P3, P4 and P5) were detected and the results showed the presence of events in the P2 regions when the cells should only be observed in the purified portions of P3, P4 and P5. Similarly, cells containing in P5 appeared in the same position as the P4 cells. The populations acquired after separation (P2, P3, P4, P5) were identified in smears observed in light microscopy. The images of cellular smears showed the presence of cellular debris in P2, cells with typical morphology of lymphocytes and thrombocytes in P3 and a mixture of erythrocytes and granulocytes in P4 and The types of cells contained in each population separated by cell sorting FACS Aria III were acquired and photographed by the cytometer ImageStream. The degree of purification of each population demonstrated by cell sorting FACS Aria and cytometer ImageStream was verified by quantifying the cells of each population. Lymphocytes were the most prevalent cell type in the P3 region. In other regions, erythrocytes predominated in more than 95% of P4 events. Granulocytes were present in P5 and in a minority in the P4 region (about 5%) (Figure 3)

The animals inoculated with *A. hydrophila* showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in erythrocyte and granulocyte counts 6 and 24 HPI when compared to animals inoculated with saline. (Figure 4). Similarly, fish inoculated with *A. hydrophila* showed lower counts ( $p > 0.05$ ) in

the number of circulating lymphocytes 6 and 24 HPI (Figure 3). A significant increasing ( $p < 0.05$ ) was observed in the production of reactive oxygen species 6 and 24 HPI in animals inoculated with bacteria in relation to those inoculated with saline (Figure 3).

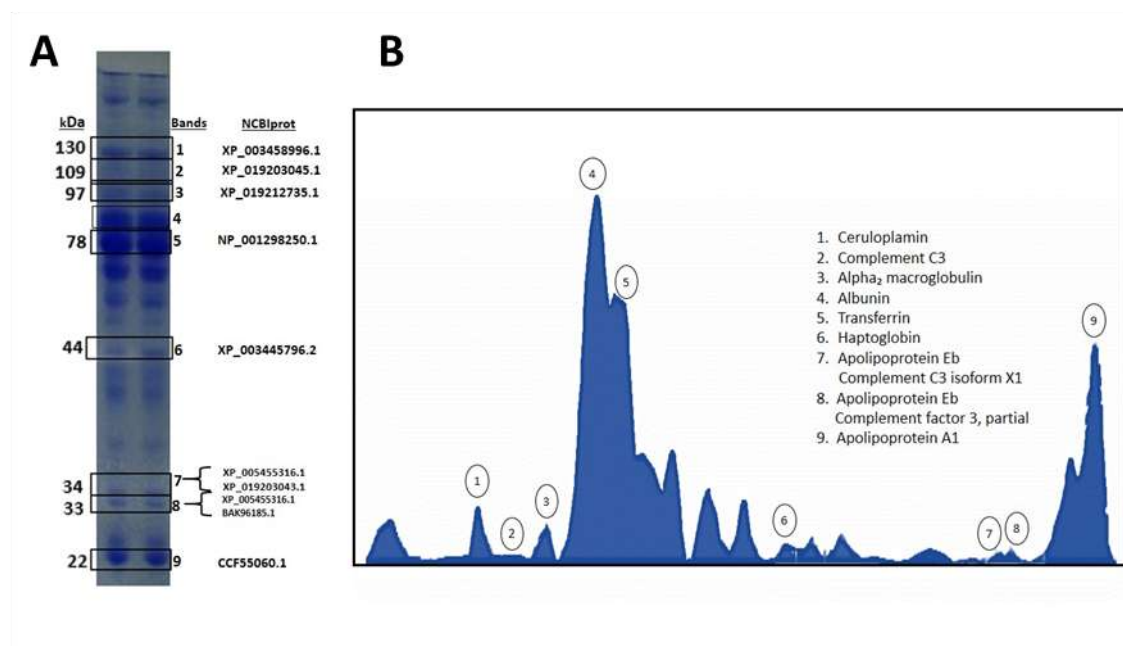


**Figure 3.** Blood cells of *O. niloticus* separated by FACSaria and imagens acquisition by ImagemStream and light microscopy. Total blood following by second reading in same cytometer of P2, P3, P4 and P5. P2 – cellular debris; P3 - Portion rich in lymphocytes / thrombocytes; P4 – portion rich in erythrocytes and P5 – portion rich in granulocytes. SSC (side scatter) X FSC (forward scatter).

#### Protein identification of variable protein bands

Electrophoretic traces of 30 protein fractions were found by computerized densitometry whose molecular weights ranged from 22 to 200 kDa. As an attempt to characterize the acute phase proteins from the plasma of *Oreochromis niloticus*, 10 differential bands were submitted (Figure 2) to in gel trypsin digestion coupled to mass spectrometric analysis resulting in the identification of proteins present in the 10 bands. By LC-MS/MS analysis, proteins of the main acute phase proteins including ceruloplasmin, complement C3,  $\alpha_2$  macroglobulin, albumin, transferrin, haptoglobin, apolipoprotein A1, complement C3 isoform X1, complement factor 3, and apolipoprotein Eb, as well as the less abundant

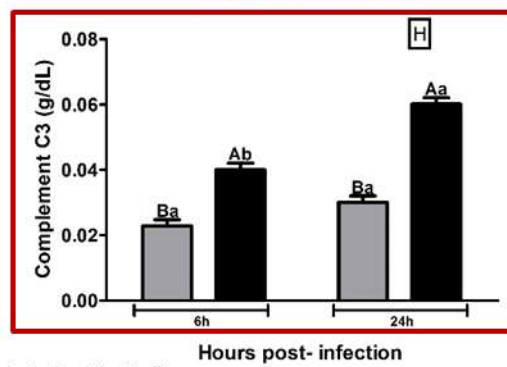
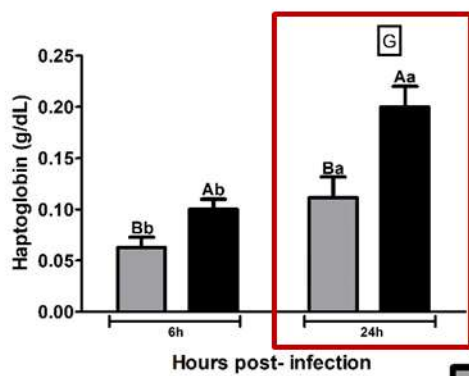
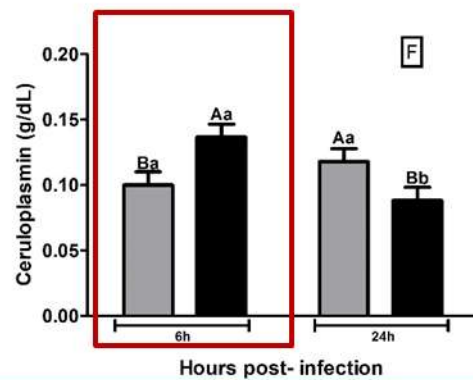
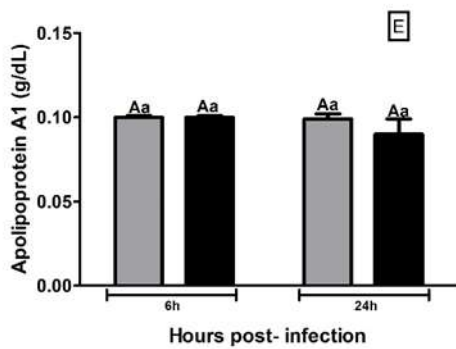
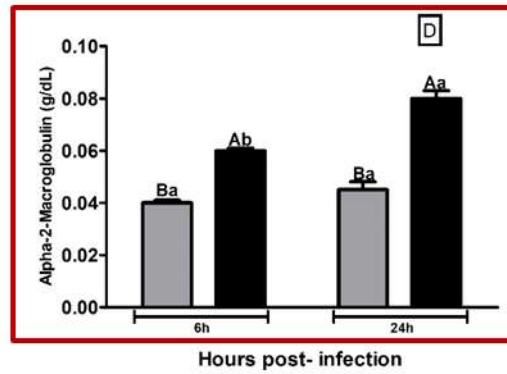
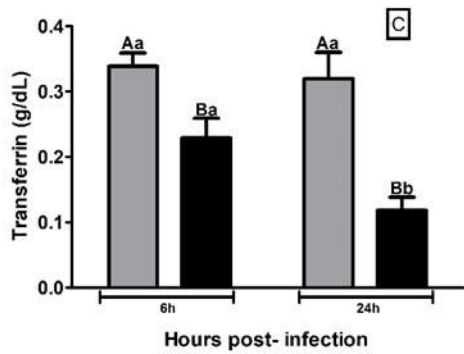
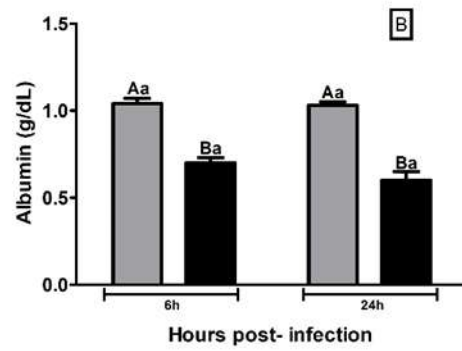
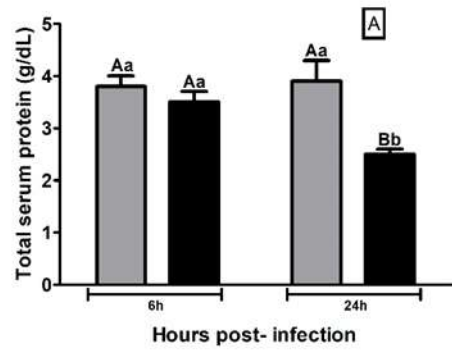
components were identified in the bands of variable intensity at the molecular mass range of 10-122 kDa confirming the significant variability observed on the *O. niloticus* specimens SDS-PAGE profiles (Figure 2). Notably, some bands of molecular mass ~34 kDa and lower contained complement C3 isoform X1, complement factor 3, and apolipoprotein Eb indicating that the latter might be derived from protein autolysis (bands 7 and 8). Overall, the majority of the identified bands contained more than one type of protein indicating the co-migration of polypeptide chains of different proteins yet with similar molecular masses.



**Figure 4.** SDS polyacrylamide gel and densitometry tracing of serum protein in acute inflammatory response in tilapia 6 and 24 hours post-infection.

Fish inoculated with *A. hydrophila* showed a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in the amount of total protein, albumin, and transferrin when compared to the animals from the saline control group 6 and 24 hours post infection (Figure 3). The levels of haptoglobin, alpha<sub>2</sub> macroglobulin and complement C3 increased significantly ( $P < 0.05$ ) in tilapia blood with infectious aerocystitis 6 and 24 HPI, regarding the study of the evolution of the inflammatory reaction showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) in relation to the control group these three proteins between the periods of 6 and 24 HPI (Figure 3). In addition, infected tilapias showed significant variations ( $P < 0.05$ ) in ceruloplasmin blood levels with an increasing in the acute phase (6 HPI) followed by a decreasing 24 HPI in comparison to the values observed in the control animals (Figure 3). There were no significant changes ( $P > 0.05$ ) in serum levels of

apolipoprotein A1 in tilapia submitted to different treatments, as well as in the evolution of both treatments over time (Figure 3).



Inoculated with Saline  
 Inoculated with *A. hydrophila*

**Table 1:** Gene subjected to PCR and access to the sequence in NCBI GenBank.

Gene	rDNA PCR amplification		BLAST Details			
			Organism	Nº Gen Bank	Query	Max InD
16S rRNA	Forward	AGA GTT TGA TCC	<i>Aeromonas hydrophila</i>	JN559379	1688	100%
	primer	TGG CTC AG				
	Reverse	GGT TAC CTT GTT				
	primer	ACG ACT T				

## DISCUSSION

Several studies have used fish as models to the physiopathology of inflammatory diseases with an interest in human medicine (Manrique et al., 2015; MacRae et al., 2015; Huang et al., 2014; Dang et al., 2016a, Dang et al., 2016b; Wertman et al., 2016). Whereas the mammalian acute phase response is well studied, in fish lacks characterization. In present study, we evaluated the alterations of the protein fractions in fish during acute inflammatory reaction by infectious stimulus, presenting similar profiles to those observed in humans (Gabay & Kushner, 1999), and the data from this experimental study contribute to further elucidation of the APP modulation in fish model. Here we observed an increased in positive APPs such as ceruloplasmin, haptoglobin, alpha-2-macroglobulin and complement system factor C3. On the other hand, we found a significant decrease in albumin and transferrin.

The release of cytokines by inflammatory cells such as macrophages and neutrophils into the bloodstream contributed in synthesis of acute-proteins by fish hepatocytes (Suvra et al., 2017). According to Vandevyver et al. (2014), acute phase proteins–regulation by glucocorticoids, IL-6 cytokine and plasma APPs levels are rapidly altered depending on the intensity and type of the stimulus (Güleç & Cengizler, 2012).

Among the proteins that were strongly influenced by the *A. hydrophila* infectious stimulus in tilapias, the high molecular weight  $\alpha$ 2-macroglobulin (95 to 115 kDa) multifunctional protein showed up regulation in their plasma levels. In crustaceans, this protein has a biological role in the blood coagulation system and in phagocytosis (Ponprateep et al., 2017). Other studies have reported the involvement of APPs in the host immune response,  $\alpha$ 2-macroglobulin in humans is capable of binding to a range of cytokines including TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , which play a key role in the inflammatory response (Vandevyver et al., 2014)

The  $\alpha$ 2-macroglobulin binds to iron, zinc and copper ions in plasma, even stronger than albumin. It was identified as a copper transport protein in the blood plasma by chelating about 10-15% of copper in human plasma (Liu et al. 2007). For Porcheron and contributors (2013), the acquisition and utilization of metal ions by microorganisms are essential for their survival. For these authors, part of the strategies to the host defense system against infection consists of sequestering these metal ions.

After infection by *A. hydrophila* in tilapia, we observed elevated levels of ceruloplasmin and haptoglobin in acute inflammatory response. These proteins are responsible for transporting more than 95% of total copper in healthy human plasma and ceruloplasmin is the main copper-delivery in the blood (Hellman & Gitlin, 2002), Besides that, plays a role in iron metabolism by exhibiting dependent oxidase activity (Song & Dunaief, 2013). The haptoglobin



is a natural bacteriostat (Eaton et al., 1982) and a hemoglobin-binding protein (Eaton et al., 1982; Levy et al., 2010). Haptoglobin increase clearance of free hemoglobin and also limit its utilization by bacteria (Eaton et al., 1982). Haptoglobin demonstrates anti-inflammatory activity by binding to CD11b / CD18 integrins, suggesting that this APP can regulate MAC-1 dependent cellular function *in vivo* (El Ghmati et al. 1996).

Findings from this study showed that *A. hydrophila* infection increased levels of  $\alpha$ 2M, haptoglobin, and ceruloplasmin and together demonstrates the strategy of the fish organism to minimize the availability of these metal ions to bacterial metabolism, considering that this bacteriosis causes hemorrhagic septicemia and hemolytic anemia. The dissemination of *A. hydrophila* in blood and kidney tissues, associated with a decrease in the number of circulating erythrocytes and in the histopathological lesions in the evolution of the infectious condition to corroborate experimental findings.

According to Li & Lu (2006),  $\alpha$ 2M was able to inhibit the extracellular protease of *A. hydrophila* (AhECPase) in carp, therefore, according to these authors, this APP may play a role in the resistance to infection by this pathogen. Bapat et al. (2015) observed a significant increase in  $\alpha$ 2M and haptoglobin expression in cases of *Mycobacterium tuberculosis* infection in humans. Enrichment of  $\alpha$ 2M with microparticles satisfactorily modulated the immune response and survival in human sepsis (Dalli et al., 2013).

A recognition of microorganisms, activation of the immune response and Interleukin-22 mediates are considered key elements for synthesis of acute-phase protein in the liver during the pathogenesis of sepsis (Sander et al., 2010). Regarding the evolution of the acute-phase response in mammals, the C3 component of the complement increases about 50% (Gruys et al. 2006). This protein plays a central role in the complement system and contributes to innate immunity, including humans with C3 deficiency susceptible to bacterial infections (Matsuyama et al., 2001). *A. hydrophila* infection in tilapias resulted in a significant increase in plasma C3 levels, demonstrating the same response profile observed in mammals.

We observed decrease in levels of albumin and transferrin in the acute-phase response by bacterial infection. These findings corroborate and extend those from a recent study who observed a decrease in circulating levels of transferrin in tilapias in the first week after infection by *Streptococcus iniae* (Güleç & Cengizler 2012). In inflammation, occur down-regulation of transferrin-receptor expression, probably by mechanisms of interferon gamma in receptor on human mononuclear phagocytes (Byrd & Horwitz, 1993).

The transferrin membrane receptor is a key factor in the growth of immune cells due to their iron requirement. Rats iron-deficient have the T cell proliferation and immunity affected (Seligman et al., 1992). The liver represents dominant role in protein synthesis.

Among them, albumin considered to be the main plasma protein with a significant participation in intravascular oncotic pressure (Belo et al., 2012b). According to Ceciliani et al. (2002), there are no clear reasons to explain the down-regulation of some proteins during the acute-phase response. To account for these variables, in this paper we are proposing a hypothesis to explain these linkages with hypoalbuminemia during inflammation. This hypothesis would suggest that metabolic shift to the synthesis of positive APPs which would require the available amino acids in the biosynthesis of proteins directly involved with the defensive response. Hypoalbuminemia due to inflammatory processes are common findings in hospitalized humans (Gabay & Kushner, 1999), which are aggravated in malnourished patients or with renal disorders (Don & Kaysen, 2004).

The similarity in the protein response profile of tilapia and mammals during the acute phase for both positive and negative APPs can be explained in part by genetic proximity. These findings are corroborated by Howen et al., 2013 where they reported that other fish teleost known as biomodel zebrafish has its genome sequenced, sharing high similarity with the human genome. At the same time, Forn-Cuní et al. (2017) have demonstrated that the inflammatory response of this teleost fish can effectively reproduce the inflammatory process of a mammal. Besides that, the authors provided evidence that the immune signaling pathways and gene expression are well conserved throughout evolution.

Our analysis evidences that, post-infection by *A. hydrophila* showed an increase in acute inflammatory response in relation to the negative control at 24 HPI characterized by the highest accumulation of inflammatory cells over-time. At the same time, the evaluation of inflammatory cells recruitment by bacterial infection revealed a predominance of granulocytes, lymphocytes, thrombocytes and macrophages in the inflamed site at all times studied, corroborating the findings by Claudiano et al. (2013). Neutrophils are responsible to form the first line of immune response is much important for organism defense (LUSTER et al., 2005). In acute inflammation in human the neutrophils, they are the most predominant. Besides that, these short-lived cells accumulate within hours at sites of acute inflammation and are responsible for combating bacterial and fungal infections (LUSTER et al., 2005). Regarding the results obtained by recruitment of inflammatory cells, there was a significant increase and this finding can be explained by migration of blood cells to the site of inflammation as a defense mechanism. After tissue damage, occurs the degranulation of mast cells with liberation of cytokines and chemokines in modulating vascular permeability increasing the recruitment of the defense cells to the site of inflammation (LUSTER, 2005). In this study, we can correlate these blood findings with the total leukocytes counts by flow cytometry were found leukopenia. However, we group the first to utilized a flow cytometry-

based method for evaluation of blood cells in tilapia. This method is accurate and can be used in a wide range of applications (Gomes et al. 2016). Here we report the position of the cell by flow cytometry according to the morphology, size and granularity in fish. Thus, four populations in the graph were identified by cell sorting and Imagestream cytometer.

On the other hand, the presence of lymphocytes from exudate was higher post-infection at 6 HPS and had a reduction at 24 HPI. This initial increase can be explained by inflammatory response of antigenic nature with *A. hydrophila* and have originated from the functions of B lymphocytes. the peptidoglycans and lipopolysaccharides (LPS) from bacterial cell wall that are patterns of recognized of pathogenic agents. The B lymphocytes proliferate and differentiate into memory. Some of these differences seem to be determined by the stimulation historic during memory cell formation. To induce rapid recall antibody responses, the contributions of other types of cells, such as memory T follicular helper cells, have also now begun to be appreciated (KUROSAKI et al., 2015). In study performed by Castro et al. (2014) it has also been observed an increase in the inflammatory cells response, seen through the greater accumulation of lymphocytes and thrombocytes induced by carrageenan.

In study of acute inflammation, it was evaluated the respiratory burst activity by reduction of NBT, as described (BILLER-TAKAHASHI et al., 2013). Thus, for acute inflammation, fish were challenged by *A. hydrophila* and sampled at 6 and 24 HPI. There were significant differences among all the groups. These are many studies about the changes in respiratory of leukocytes. According Biller-Takahashi et al. (2013) this activity increase after pathogen-challenge indicating that phagocytes increased production of ROS by activating the enzyme NADPH oxidase which produces oxygen peroxide.

The present study concludes that the use of *O. niloticus* fish as an experimental model for the study of acute inflammation presents similar responses to those observed in humans, confirming its importance for future studies on diseases.

## REFERENCES

- Bapat, P. R., Satav, A. R., Husain, A. A., Shekhawat, S. D., Kawle, A. P., Chu, J. J., ... & Kashyap, R. S. (2015). Differential Levels of Alpha-2-Macroglobulin, Haptoglobin and Sero-Transferrin as Adjunct Markers for TB Diagnosis and Disease Progression in the Malnourished Tribal Population of Melghat, India. *PloS one*, 10(8), e0133928.
- Belo MAA *et al.* (2005). Effect of dietary supplementation with vitamin e and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus* *J. Comp. Pathol.* 133, 146–154.
- Belo MAA *et al.* (2012). Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. *Pesqu Agropec Bras* 47(7), 1015-1021.
- Belo, M. A. D. A., Moraes, J. R. E. D., Soares, V. E., Martins, M. L., Brum, C. D., & Moraes, F. R. D. (2012). Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(7), 1015-1021.
- Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Saita, M. V., Gimbo, R. Y., & Urbinati, E. C. (2013). Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2), 425-429
- Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Saita, M. V., Gimbo, R. Y. & Urbinati, E. C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Braz. J. Biol.* 73, 425-429 (2013).
- Boer, J. P., Creasey, A. A., Chang, A., Abbink, J. J., Roem, D., Eerenberg, A. J., ... & Taylor, F. B. (1993). Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infection and immunity*, 61(12), 5035-5043.
- Byrd, T. F., & Horwitz, M. A. (1993). Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. *Journal of Clinical Investigation*, 91(3), 969.
- Canonico B, Zamai L, Burattini S, Granger V, Mannello F, Gobbi P, et al. Evaluation of leukocyte stabilisation in TransFix® -treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy. *J Immunol Methods*. 295: 67-78, 2004.
- Carneiro, P. C. F., & Urbinati, E. C. (2001). Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research*, 32(4), 297-304

- Castro, M.P. *et al.* Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fish Shellfish Immun.* 31, 284–290 (2014).
- Ceciliani, F., Giordano, A., & Spagnolo, V. (2002). The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and peptide letters*, 9(3), 211-223.
- Claudiano, G.S. *et al.* Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and proinflammatory cytokines. *Fish Shellfish Immun.* 34, 1057–1062 (2013).
- Conrad, D. M., Hoskin, D. W., Liwski, R., & Naugler, C. (2016). A re-examination of the role of the acute phase protein response in innate cancer defence. *Medical hypotheses*, 93, 93-96.
- Dalli, J., Norling, L. V., Montero-Melendez, T., Canova, D. F., Lashin, H., Pavlov, A. M. & Perretti, M. (2014). Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO molecular medicine*, 6(1), 27-42.
- Dang, M., Rachel, F. & Zon, L. I. Identifying novel cancer therapies using chemical genetics and zebrafish. *Adv. Exp. Med. Biol.* 916, 103-244 (2016a).
- Dang, M., Rachel, F., Henderson, R. E., Garraway, L.V. & Zon, L. I. Long-term drug administration in the adult zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. *Dis. Model. Mech.* 9, 811-820 (2016b).
- Don, B. R., & Kaysen, G. (2004). Poor nutritional status and inflammation: serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. In *Seminars in dialysis* Vol. 17, No. 6, pp. 432-437.
- Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews. Immunology*, 11(2), 98
- El Ghmati, S. M., Van Hoeyveld, E. M., Van Strijp, J. G., Ceuppens, J. L., & Stevens, E. A. (1996). Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *The Journal of Immunology*, 156(7), 2542-2552.
- Forn-Cuní, G., Varela, M., Pereiro, P., Novoa, B., & Figueras, A. (2017). Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Scientific Reports*, 7.
- Gabay, C., & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England journal of medicine*, 340(6), 448-45.
- Gomes, J. M., Ribeiro, H. J., Procópio, M. S., Alvarenga, B. M., Castro, A. C., Dutra, W. O. & Junior, J. D. C. (2015). What the Erythrocytic Nuclear Alteration Frequencies Could Tell Us about Genotoxicity and Macrophage Iron Storage?. *PloS one*, 10(11), e0143029

- Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A., & Koopmans, S. J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(11), 1045-1056.
- Güleç, A. K., Cengizler, I. Determination of acute phase proteins after experimental *Streptococcus iniae* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36,380-387 (2024).
- Guo, X., Tang, P., Li, X., Chong, L., Zhang, X., & Li, R. (2016). Association between two  $\alpha$ -2-macroglobulin gene polymorphisms and Parkinson's disease: a meta-analysis. *International Journal of Neuroscience*, 126(3), 193-198.
- Hellman NE, Gitlin JD (2002). "Ceruloplasmin metabolism and function". *Annual Review of Nutrition*. 22: 439–58.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... & McLaren, S. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498.
- Huang, S. Y. *et al.* A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. *PLoS one*. 9, e104414 (2014).
- Inoue, T.; Moritomo, T.; Tamura, Y.; Mamiya, S.; Fujino, H.; Nakanishi, T. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology*, v.13, p. 379-390, 2002.
- Jain, S., Gautam, V., & Naseem, S. (2011). Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 118.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685 (1970).
- Langlois, M. R., & Delanghe, J. R. (1996). Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical chemistry*, 42(10), 1589-1600.
- Levy, A. P., Asleh, R., Blum, S., Levy, N. S., Miller-Lotan, R., Kalet-Litman, S., ... & Farbstein, D. (2010). Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxidants & redox signaling*, 12(2), 293-304.
- Li, C. H., Lu, X. J., Li, D. F., & Chen, J. (2014). Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Vibrio anguillarum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish & shellfish immunology*, 37(1), 108-114.
- Li, F. L., & Lu, C. P. (2006). Purification and characterization of  $\alpha$  2-macroglobulin from grass carp *Ctenopharyngodon idellus*: Cloning a segment of the corresponding gene. *Fish & shellfish immunology*, 20(4), 474-481.

- Liu, N. M., Nguyen, T., Kidane, T., Moriya, M., Goforth, J., Chu, A., & Linder, M. (2006). Transcupreins are serum copper-transporters of the macroglobulin family, and may be regulated by iron and copper. *The FASEB Journal*, 20(4), A553-A554.
- Liu, N., Lo, L. S. L., Askary, S. H., Jones, L., Kidane, T. Z., Nguyen, T. T. M., ... & Westbrook, T. (2007). Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(9), 597-608.043.
- Luster, A. D., Alon, R. & Andrian, U. H. V. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* 6, 1182-1190 (2005).
- MacRae, M. A. & Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*. 14, 721-731 (2015)
- Manrique, W. G. *et al.* Expression of cellular components in granulomatous inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus* model. *PloS one*. 10, e0241625 (2015).
- Matsuyama W, Nakagawa M, Takashima H, Muranaga F, Sano Y, Osame M (Dec 2001). "Molecular analysis of hereditary deficiency of the third component of complement (C3) in two sisters". *Internal Medicine*. 40 (12): 1254–8.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428.
- Niessen, S., Mcleod, I., & Yates, J. R. (2006). Silver staining, digestion, and extraction of peptides from an acrylamide gel for MS analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, (7), pdb-prot4661.
- Omara, F. O., & Blakley, B. R. (1994). The effects of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *British journal of nutrition*, 72(6), 899-909.
- Palhares, D.; Grisolia, C. K. (2002) Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology*, v. 25, p. 281-284,
- Ponprateep, S., Vatanavicharn, T., Lo, C. F., Tassanakajon, A., & Rimphanitchayakit, V. (2017). Alpha-2-macroglobulin is a modulator of prophenoloxidase system in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 62, 68-74.
- Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M., & Dozois, C. M. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.
- R Development Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.

- Roy, S., Kumar, V., Kumar, V., & Behera, B. K. (2017). Acute Phase Proteins and their Potential Role as an Indicator for Fish Health and in Diagnosis of Fish Diseases. *Protein and peptide letters*, 24(1), 78-89.
- Seligman, P. A., Kovar, J., & Gelfand, E. W. (1992). Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology*, 60(1), 19-26.
- Song D, Dunaief JL (2013). "Retinal iron homeostasis in health and disease". *Frontiers in Aging Neuroscience*. 5: 24.
- Tavares, B., & Lopes, S. S. (2013). The importance of Zebrafish in biomedical research. *Acta medica portuguesa*, 26(5), 583-592.
- Thieme, R., Kurz, S., Kolb, M., Debebe, T., Holtze, S., Morhart, M., ... & Birkenmeier, G. (2015). Analysis of alpha-2 macroglobulin from the long-lived and cancer-resistant naked mole-rat and human plasma. *PloS one*, 10(6), e0130470.
- Traver, D.; Paw, B. H.; Poss, K. D.; Penberthy, T. W.; Lin, S.; Zon, L. I. Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nature Immunology*, v. 4, n. 12, 2003.
- Vandevyver, S., Dejager, L., Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2014). An acute phase protein ready to go therapeutic for sepsis. *EMBO molecular medicine*, 6(1), 2-3.
- Varma, V. R., Varma, S., An, Y., Hohman, T. J., Seddighi, S., Casanova, R., ... & Moghekar, A. (2017). Alpha-2 macroglobulin in Alzheimer's disease: a marker of neuronal injury through the RCAN1 pathway. *Molecular psychiatry*, 22(1), 13-23.
- Wang, Y., Kinzie, E., Berger, F. G., Lim, S. K., & Baumann, H. (2001). Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox report*, 6(6), 379-385.
- Wertman, J., Veinotte, C. J., Dellaire, G. & Berman, J. N. The zebrafish xenograft platform: Evolution of a novel cancer model and preclinical screening tool. *Adv. Exp. Med. Biol.* 916, 289-314 (2016).
- Wessling-Resnick, M. (2010). Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annual review of nutrition*, 30, 105-122.



# CAPÍTULO III

---

## Ciclofosfamida modula a reação inflamatória aguda e crônica em peixes

### Cyclophosphamide modulated acute and chronic inflammatory reaction in fish

Ives Charlie-Silva<sup>1</sup>; Ed Johnny da Rosa Prado<sup>12</sup>; Alessandra Cristina de Moraes<sup>12</sup>; José Jurandir Fagliari<sup>3</sup>; Mônica Lopes-Ferreira<sup>4</sup>; Carla Lima<sup>4</sup>; Katia Conceição<sup>5</sup>; Wilson Gómez Manrique<sup>7</sup>; Marco Antonio de Andrade Belo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de pós graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista- Unesp-Jaboticabal –SP, Brasil Via Prof. Paulo Donato Castellane, km 05, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Universidade Estadual Paulista- Unesp-Jaboticabal –SP, Brasil. Via Prof. Paulo Donato Castellane, km 05, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia, Universidade Estadual Paulista- Unesp-Jaboticabal –SP, Brasil. Via Prof. Paulo Donato Castellane, km 05, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, São Paulo-SP-Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Bioquímica de Peptídeos, ICT UNIFESP, Rua Talim, 330 São José dos Campos, Brasil.

<sup>6</sup>Laboratório de Imunologia, Universidade Brasil – Descalvado – SP. Brasil.

## RESUMO

O presente estudo investigou os efeitos da ciclofosfamida (CYP) na modulação de proteínas de fase aguda (APPs) e acúmulo celular em exsudatos presentes na bexiga natatória de tilápias (modelo de peixe de aerocistite) e o recrutamento de leucócitos na lamínula de vidro implantadas no tecido subcutâneo. Foram utilizadas 140 tilápias (*Oreochromis niloticus*) ( $\pm 150$  g) distribuídas em 14 aquários com capacidade para 250 L de água (n = 10). Os animais foram distribuídos em dois ensaios: **Experimento I:** foram utilizados 80 animais distribuídos em quatro tratamentos: T1 - controle NAIVE; T2 - controle negativo + solução salina injetada NaCl; T3- controle positivo + injetado com *Aeromonas hydrophila*; T4- ciclofosfamida, Isopac ® Sigma (200 mg / kg, dose única, por via intraperitoneal) + injetado com *A. hydrophila*. As amostras de exsudato e sangue foram coletadas 6 e 24 horas após a infecção (HPI) para a contagem de células e determinação do fracionamento eletroforético das APPs por SDS-PAGE, digestão de

proteínas em gel e identificação por espectrometria de massa. **Experimento II:** os peixes foram alocados (n=60) em 3 grupos experimentais: G1 - controle NAIVE; G2 – controle positivo + implante de lamínula; G3 - ciclofosfamida, Isopac ® Sigma (200 mg / kg, dose única, por via intraperitoneal) + implante de lamínula. Após serem anestesiados, foram submetidos ao implante da lamínula de vidro de 10mm de diâmetro no tecido subcutâneo. As amostras de sangue foram coletadas e as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e lavadas com solução salina 0,9% após 74 e 144 horas. As amostras foram fixadas em solução de Bouin e coradas em hematoxilina-eosina. Em todas as lamínulas foram quantificados o total de macrófagos, células gigantes tipo corpo estranho e Langhans. Na evolução da aerocistite, a tilápia tratada com CYP apresentou diminuição nos valores circulantes de ceruloplasmina, complemento C3,  $\alpha$ 2-macroglobulina e haptoglobina. A avaliação do exsudato revelou diminuição ( $p < 0,05$ ) do número total de células acumuladas em peixes tratados com CYP quando comparada à resposta observada em peixes de controle positivo (T3). Em relação à contagem total de macrófagos e células gigantes no implante, observou-se aumento no acúmulo de macrófagos e formação de células gigantes ao longo do tempo (144 HPI). Ao mesmo tempo, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas contagens totais entre os grupos tratados CYP e controle negativo. Da mesma forma em mamíferos, vários estudos relataram os efeitos supressivos associados ao tratamento com este agente alquilante. O uso de 200 mg/kg de ciclofosfamida em *O. niloticus*, inibe a resposta inflamatória e induz leucopenia e trombocitopenia em processos inflamatórios agudos e crônicos.

**Palavras-chave:** Inflamação, imunologia, modelos experimentais, proteína de fase aguda.

### ABSTRACT

The present study investigated the effects of cyclophosphamide (CYP) on the modulation of acute phase proteins (APPs) and cellular accumulation in exudates present in the swim bladder of tilapia (aerocystitis fish model) and the recruitment of leukocytes on a glass cover slip implanted in the subcutaneous tissue. One hundred forty tilapia (*Oreochromis niloticus*) ( $\pm 150$  g) were distributed in 14 aquariums with capacity of 250 L (n = 10), for two trials. Experiment I: For this purpose, 80 fish were distributed in four treatments: T1 – naïve control; T2 - negative control + injected with NaCl solution; T3- positive control + injected with *A. hydrophila*; and T4- cyclophosphamide (200 mg/kg) + injected with *A. hydrophila*. Samples of exudate and blood were collected 6 and 24 hours post-inoculation (HPI) for cell counts and determination of the APP electrophoretic fractionation by SDS-PAGE, in-gel protein digestion and mass spectrometric identification. Experiment II: Fish were allocated (n = 60) in 3 experimental groups: G1 – naïve control; G2 - positive control + coverlet implant; and G3 - cyclophosphamide (200 mg/kg, single dose intraperitoneally) + cover slip implant. The glass coverslips (10 mm diameter) were implanted after anesthetization in the subcutaneous tissue. Blood samples were collected and the coverslips were carefully removed and washed with 0.9% saline 74 and 144 hours implantation. Then they were fixed in Bouin's solution and stained with hematoxylin-eosin. The totals of macrophages, foreign body type giant cells and Langhans cells on all coverslips were quantified. With respect to aerocystitis evolution, tilapia treated with CYP presented decrease in the circulating values of ceruloplasmin, complement C3,  $\alpha$ 2 macroglobulin and haptoglobin. The exudate evaluation revealed decrease ( $p < 0.05$ ) of the total number of cells accumulated in fish treated with CYP when

compared the response observed in positive control fish (T3). The total count of macrophages and giant cells after implantation increased with time until 144 HPI. At the same time, there was a significant difference in the total counts between the CYP and negative control groups. Like for mammals, several studies have reported the suppressive effects associated with treatment with this alkylating agent in fish. The treatment with 200 mg of cyclophosphamide/kg of body weight in *O. niloticus* modulated acute phase protein responses and cell accumulation at the inflamed site, demonstrating the potential of this experimental model for pathophysiological studies during acute and chronic inflammatory reaction.

**Keywords:** Inflammation, immunology, experimental models, acute-phase protein.

## 1. INTRODUÇÃO

A ciclofosfamida (CYP) é um agente alquilante multifuncional com poderoso efeito citotóxico e imunossupressor (de Jonge et al., 2005). Seu mecanismo de ação é independente da fase do ciclo celular e pode causar danos agudos aos tecidos formadores de células com a interrupção do crescimento celular, atividade mitótica, diferenciação e função principalmente por meio da interação com o DNA, ocasionando, assim, redução transitória nas células de defesa circulantes (Vernet et al., 2004).

Devido aos contínuos avanços em ciências biomédicas, os medicamentos imunossupressores estão sendo muito utilizados tanto na medicina humana quanto na veterinária para tratamento de diferentes formas de câncer e doenças autoimunes (Wójcik & Dabkowska, 2010; Mullins & Alexander, 2017; Sekiguchi et al., 2017). Nos últimos anos, a CYP tem sido muito empregada como agente imunossupressor na prevenção da rejeição de enxerto e órgãos, além do tratamento de distúrbios autoimunes crônicos, como artrite reumatóide, esclerose múltipla e lúpus eritematoso (Ghobadi et al., 2017). Além disso, tem sido utilizada como moduladora das células T com objetivo de aumentar a eficácia da terapia imune adaptativa (Mullins & Alexander, 2017). Segundo o estudo de Yunyun et al. (2017), os efeitos da CYP podem ser potencializados quando combinados com glicocorticoide.

Após a lesão tecidual, as células inflamatórias (neutrófilos e monócitos/macrófagos) secretam citocinas na corrente sanguínea tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 estimulando os hepatócitos a produzirem proteínas envolvidas diretamente nos mecanismos de defesa do organismo. Essas proteínas são conhecidas como proteínas de fase aguda (APPs) e os seus níveis no plasma são modulados rapidamente no início da inflamação (Suvra et al., 2017). Neste contexto, há evidências cada vez maiores de que os componentes da resposta de APPs contribuem para a defesa do

hospedeiro em doenças infecciosas (Conrada et al., 2016). Atuando como parte do sistema imune inato, o aumento de APPs “positivas” auxilia na destruição ou inibição do crescimento de microrganismos, como por exemplo a proteína C reativa, fatores do sistema complemento, ferritina, ceruloplasmina, haptoglobina, alfa-2-macroglobulina, entre outras. Já com relação às APPs "negativas", ocorre uma diminuição na inflamação, tais como albumina, transferrina, transtiretina, antitrombina e transcortina (Gabay & Kushner, 1999).

Recentes avanços na investigação sobre tratamentos de doenças inflamatórias (MacRae & Randall, 2015; Huang et al., 2015; Wu et al., 2016; Howe et al., 2017; Witten et al., 2017; Liu et al., 2017; Brugman & Nieuwenhuis, 2017), assim como estudos farmacológicos (MacRae & Randall, 2015; Mbewe et al., 2016) têm sido relatados utilizando-se peixes como modelos experimentais. Modelos experimentais clássicos em mamíferos estão sendo empregados há décadas para o estudo da evolução da resposta inflamatória tanto em fase aguda quanto crônica. Os peixes teleósteos têm demonstrado diversas vantagens sobre outras espécies animais podendo funcionar como uma alternativa ao uso de roedores, ou mesmo trazer informações complementares quando utilizados como modelo para estudos de doenças, prospecção de novos fármacos, entre outros (Tavares & Santos Lopes, 2013).

Desta forma, baseados na importância de estabelecer novos modelos experimentais, como a utilização de peixes, este estudo teve como objetivo adaptar e desenvolver um protocolo experimental para estudar a modulação das proteínas de fase aguda durante a reação inflamatória sistêmica induzida pela inoculação de *Aeromonas hydrophila* e o recrutamento de leucócitos na fase crônica em tilápias-do-Nilo e os efeitos da CYP nesta modulação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Comitê de ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Jaboticabal, de acordo com o protocolo nº 11.860/16.

### **2.2. Peixes e protocolo experimental**

Foram utilizadas 140 tilápias-do-Nilo (*O. niloticus*) com peso médio de 150,0±10,2 g oriundas de uma mesma desova. Os peixes foram alocados em 14 tanques de plástico com volume útil de 250/L de água, em sistema de recirculação (vazão de 1 L/min), temperatura controlada e equipado com lâmpada ultravioleta.

Após o transporte para os tanques, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltassem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L (Carneiro & Urbinati, 2001). Os animais receberam dieta comercial extrusada (32% de proteína bruta), duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde (às 9:00 – 16:00 horas), correspondendo a 3% da biomassa dos tanques. A qualidade da água permaneceu dentro do intervalo adequado para o conforto dos animais (temperatura = 27,25 ± 1,0 ° C, pH = 7,50 ± 0,5 e condutividade elétrica = 114,81 ± 11,5µS / cm).

**Tabela 1** - Distribuição dos peixes nos grupos experimentais.

Group0	Experimento I – Inflamação aguda	Tempo pós-infecção	
		6 h	24 h
T0	Controle	N=10	N=10
T1	Controle negativo + Injetado NaCl solução salina	N=10	N=10
T2	Controle positivo + Injetado <i>A. hydrophila</i>	N=10	N=10
T3	Ciclofosfamida (200 mg/kg) + Injetado <i>A. hydrophila</i>	N=10	N=10
Group	Experimento I – Inflamação crônica	Tempo pós-implantação	
		72 h	144 h
T0	Controle	N=10	N=10
T1	Controle positivo + Implante de lamínula	N=10	N=10
T2	Ciclofosfamida (200 mg/kg) + Implante de lamínula	N=10	N=10

### 2.3. Anestesia dos peixes

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para a administração do inóculo e implante da lamínula e 1:500 no momento da eutanásia. Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 92,8° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (Carneiro & Urbinati, 2001b)

### 2.4. Ensaio I – Modelo de aerocistite aguda

No modelo de aerocistite, os peixes (n=80) foram distribuídos por sorteio em 4 aquários de 100 L contendo 20 animais cada e alocados em quatro grupos experimentais: **T1** - NAIVE; **T2** - controle negativo + injetado solução salina NaCl; **T3**- controle positivo + inoculo de *A. hydrophila*; **T4**- ciclofosfamida código produto C7397, Isopac<sup>®</sup> Sigma (200 mg / kg, dose única, por via intraperitoneal) + inoculo de *A. hydrophila*. Os peixes foram inoculados com *A. hydrophila* na bexiga natatória. O isolado de bactéria foi obtido de animais naturalmente infectados, apresentando lesões compatíveis com aeromonose. Para confirmação da espécie, foi feita extração de DNA e reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene 16S rDNA com posterior sequenciamento. As sequências obtidas foram visualizadas e manipuladas no programa Sequencer 5.0 (Gene Codes Corporation), Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – Crebio (UNESP Jaboticabal, SP). Com a ferramenta BLASTn, o fragmento foi comparado com as sequências depositadas no GenBank (Tabela 2). O resultado do sequenciamento confirmou a espécie *Aeromonas hydrophila*. Após a identificação, foi realizado a quantificação e confecção do inoculo na concentração de  $3 \times 10^9$  UFC/mL (unidade formadora de colônia). No dia zero, utilizando-se seringas de insulina 1.0 mL os peixes foram inoculados na bexiga natatória com 0.1 mL do inoculo de *A. hydrophila* para cada 30 g de peixe.

**Tabela 2:** Gene submetido à PCR e o acesso à sequência no NCBI GenBank.

Gene	rDNA PCR amplification		BLAST Details			
			Organism	Nº Gen Bank	Query	Max InD
16S rRNA	Forward primer	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	<i>Aeromonas hydrophila</i>	JN559379	1688	100%
	Reverse primer	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T				

#### 2.4.1. Avaliação do exsudato inflamatório

Para a avaliação do acúmulo de células totais do exsudato inflamatório, nos tempos pré-estabelecidos de 6 e 24 horas após infecção, os animais (n=80) foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína, como descrito anteriormente (item 2.3). Em seguida, foi realizada a necropsia e para ter acesso à bexiga natatória e realizada lavagem com 1 mL de solução gelada de PBS, a 5% de EDTA. Após lavagem, recolheu-se um volume total 1 mL do exsudato com pipeta Pasteur estéril e descartável transferindo-o para um tubo falcon sob refrigeração e centrifugada a 1000 g por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com a adição de 100 µL de PBS. Uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscópio de luz e calculado o valor de células pelo fator de diluição.

#### **2.4.2. Contagem de leucócitos e trombócitos**

A determinação da contagem total de leucócitos e trombócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando a solução de Natt & Herrick (1952) como diluente na proporção de 1:240 v/v. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas com amostragem de 200 células. Para contar os leucócitos e trombócitos, dez campos foram contados em cada esfregaço estabelecendo-se o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias & Moraes, 2003).

#### **2.4.3. Atividade respiratória dos leucócitos**

A atividade respiratória dos leucócitos foi realizada seguindo a técnica descrita por Biller-Takahashi et al., (2013). Brevemente, foram coletados 0,5 mL de sangue periférico com heparina de cada peixe em que 100 µL de sangue foram transferidos para tubo tipo Eppendorf, acrescentando-se 100 µL de NBT (0,2% w/v PBS – Sigma®). Esta mistura foi incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente (25°C), no escuro. Seguidamente as amostras foram agitadas em vortex e retirado 50 µL de cada amostra e transferidas para outro tubo tipo Eppendorf, acrescentando-se 1 mL de N, N- dimetil formamida - DMF (Sigma®) homogeneizado e centrifugado a 3000 G durante 5 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura do sobrenadante em 540 nm (Biller-Takahashi et al. 2013) em espectrofotômetro previamente calibrado com o branco. Para o branco, utilizaram-se todos os passos utilizando 100 µL de água destilada no lugar do sangue.

#### **2.4.4. Concentração proteína total**

Aliquotas de sangue dos peixes por punção do vaso caudal foram colocadas em microtubos de 2,0 mL, sem anticoagulante, para separação do soro. A amostra foi centrifugada a 3000 G durante 10 minutos a 4 °C. O soro separado foi utilizado para determinação colorimétrica das concentrações de proteínas totais em espectrofotômetro (Belo et al. 2012).

#### **2.4.5. Eletroforese das proteínas de fase aguda**

O fracionamento eletroforético foi realizado em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970) e modificada especificamente para esse ensaio, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI-VERTICALELEKTROPHORESIS CELLS®- BIO-RAD) com amostra de soro.

Para polimerização do gel foi necessária a adição de 15,0 µL de tetrametiletilenodiamina e 0,3 µL de persulfato de amônia a 10%. A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 36,30g de tris-base, 112,50g de glicina, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. A parte superior da placa que contém o gel entrou em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10g de SDS, em um litro de água destilada estéril. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10 µL de soro sanguíneo diluídos em 30 µL de tampão-fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL das referidas amostras foi depositada no fosso do gele a placa colocada em suporte apropriado, em contato com solução tampão (pH 8,5) e submetida à corrente elétrica de 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel foi corado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uma coloração uniforme e, em seguida, retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentassem nítidas.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados por densitometria computadorizada (SHIMADZU CS-930) por meio do escaneamento das amostras. Para a identificação das proteínas foi utilizado marcador como padrão (SIGMA MARKER™, wide range, 6,5 a 200 KD) de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 KD. Para a avaliação densitométrica das bandas protéicas foram feitas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.



#### **2.4.6. Digestão de proteína no gel e identificação por espectrometria de massa**

As bandas das proteínas do SDS-PAGE foram digeridas com tripsina realizada de acordo com Niessen et al. (2006), com modificações e analisadas por espectrometria de massa LC-MS / MS. As amostras de peptídeos (4,5 µl) foram injetadas em uma coluna de C18 (180 µm id x 20 mm) (Waters, Milford, MA) com 100% de solvente A (0,1% de ácido fórmico) a 15 µL / min durante 3 min. Os peptídeos foram então eluídos sobre uma coluna C18 analítica (100 µm id x 100 mm) (Waters, Milford, MA) utilizando um gradiente de 20 min a uma taxa de fluxo de 600 nL / min, em que o solvente A era 0,1% de ácido fórmico e o solvente B era 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo. O gradiente foi 0-3% do solvente B em 1 min, 3-60% de B em 14 minutos, 60-80% de B em 2,5 min, 80% de B durante 1 min, depois de volta a 3% de B em 1,5 min. Um espectrômetro de massa ESI Q-TOF Ultima (Waters, Milford, MA) foi usado para adquirir os espectros. A tensão e a temperatura do pulverizador foram ajustadas a 3,4 kV e 100 ° C, respectivamente, e o instrumento foi operado em modo dependente de dados, no qual uma varredura MS completa foi adquirida na faixa m / z de 200-2000 seguida de aquisição MS / MS. Usando a dissociação induzida por colisão dos três íons mais intensos da verificação MS. A exclusão de pico dinâmico foi aplicada para evitar o mesmo m / z a ser selecionado para as próximas 45 s. Os arquivos de dados brutos dos espectros de fragmentos foram processados pelo ProteinLynx 2.2 (Waters, Milford, MA) e convertidos para o formato \*pkl. Os espectros de fragmentos resultantes foram pesquisados usando o mecanismo de busca Mascot (versão 2.4.1) (Matrix Science, Reino Unido) contra a base de dados UniProt e NCBIInr restrita à classe Actinopterygii com uma tolerância de 1.5 Da e tolerância ao fragmento de 1.0 Da. O derivado de Iodoacetamida da cisteína e a oxidação da metionina foram especificados no Mascot como modificações fixas e variáveis, respectivamente. As identificações pelo mascote exigiram escores de íons maiores do que os índices de identidade associados e 20, 30, 40 e 40 para peptídeos isolados, duplamente, triplos e quadruplicamente carregados, respectivamente.

#### **2.5. Experimento II- Implante de lamínula**

Para o segundo ensaio, os peixes foram aleatoriamente distribuídos (n=60) por sorteio em 6 aquários de 100 L contendo 10 animais cada e alocados em 3 grupos experimentais: **G1** - controle NAIVE; **G2** – controle positivo + Implante de lamínula; **G3** - ciclofosfamida código produto C7397, Isopac ® Sigma (200 mg / kg, dose única,

por via intraperitoneal) + implante de lamínula. Após serem anestesiados, foram submetidos ao implante da lamínula de vidro de 10mm de diâmetro no tecido subcutâneo dorso cranialmente, atrás do opérculo esquerdo seguindo técnica descrita por Petric (2003). Com o auxílio de um bisturi foram removidas as escamas na área do implante e realizada uma pequena incisão de 5 cm dividindo o tecido. Após a abertura do espaço morto foi implantada a lamínula. Em seguida, utilizou-se fio de sutura agulhado Catgut Simples Nº 5 para fechamento. Assim, cada peixe teve uma lamínula implantada. Após o manuseio experimental, os animais voltaram novamente nos aquários com aeração e fluxo contínuo de água e foram amostrados em dois períodos: 74 e 144 horas após o implante para avaliação da resposta de recrutamento celular. Em seguida, realizou-se a eutanásia por imersão em benzocaína diluída na água (1:500) e as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e lavadas com solução salina 0,9%. Então fixadas em solução de Bouin por cerca de um minuto e coradas em hematoxilina-eosina. Para avaliar a resposta inflamatória, em todas as lamínulas foram quantificadas o total de macrófagos, células gigantes tipo corpo estranho e Langhans. A contagem foi realizada sob microscópio de luz sob aumento de 400x, em dez campos por lamínula, totalizando 100 campos contados por tratamento. Além disso, foram colhidas amostras de 1 mL de sangue de 60 peixes para as contagens de leucócitos e trombócitos e a atividade respiratória dos leucócitos, conforme descrito no experimento I (ensaio de inflamação aguda).

## **2.6. Análise estatística**

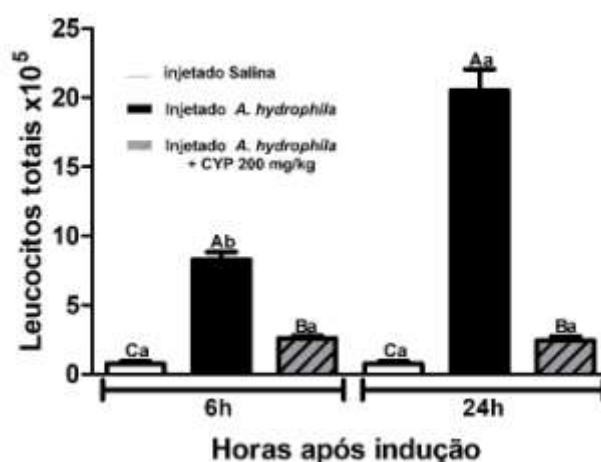
A normalidade dos dados foi mensurada por meio do teste Shapiro-Wilk. Após a normalidade, os dados foram submetidos à análise de variância por meio de delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas no tempo “Split Plot Design”, com subunidades no tempo, utilizando-se o pacote estatístico do software R core team (2016). As comparações múltiplas foram aferidas pelo Teste de Tukey ao nível de 95%.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Experimento I – Inflamação aguda**

#### **3.1.1. Exsudato inflamatório**

A contagem de células totais acumuladas no exsudato apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em peixes inoculados com *A. hydrophila*. Após a inoculação, o controle positivo foi o grupo que apresentou maior recrutamento de células inflamatórias no exsudato ao longo do tempo, mostrando incremento altamente significativo ( $p < 0,05$ ) 24 (HPI) (Figura 1). Por outro lado, observou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no acúmulo de células totais na região inflamada em relação ao grupo controle positivo. No entanto, no controle negativo, não foi observada diferença na contagem de células totais no exsudato (Figura 1).

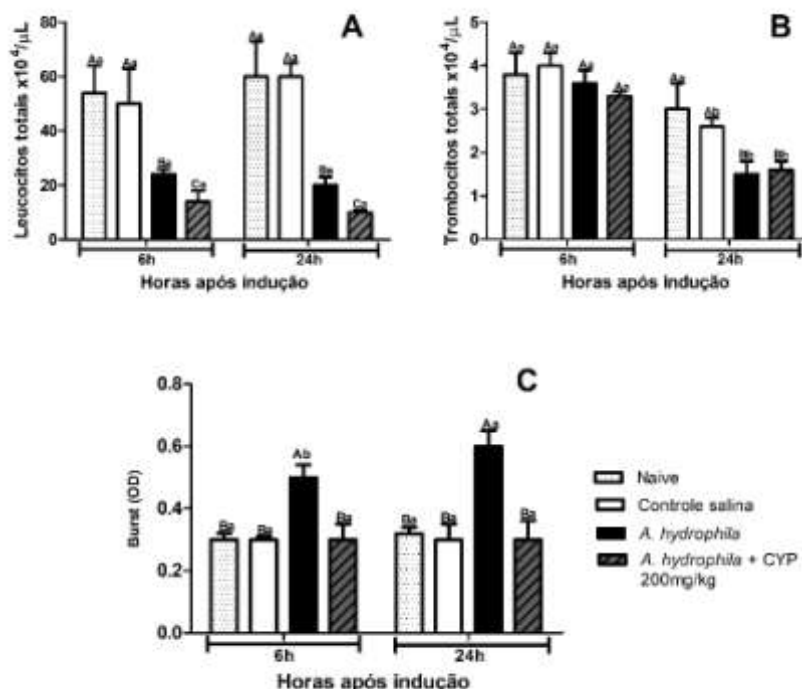


**Figura 1.** Valores médios do número total de leucócitos provenientes de tilápias 6 e 24 horas pós-indução. A análise de variância é representada por letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e letras minúsculas entre os tempos. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA + teste post-hoc de Tukey).

#### 3.1.4. Avaliação dos leucócitos, trombócitos e atividade respiratória de leucócitos

Em relação às contagens de leucócitos totais no sangue periférico no ensaio agudo, todos os peixes inoculados com a bactéria apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de leucócitos. Além disso, os animais tratados com CYP demonstraram valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) em todos os momentos. Os demais grupos não diferiram entre si (Figura 2). Nas contagens de trombócitos, os peixes injetados com a bactéria apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) 24 HPI e não diferiu do grupo tratado com CYP.

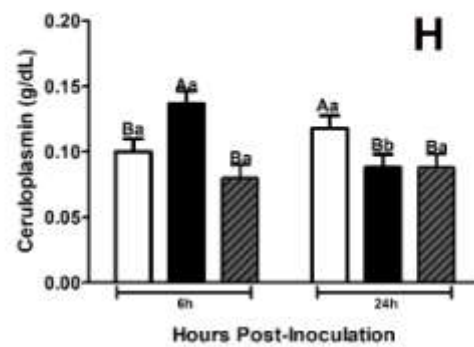
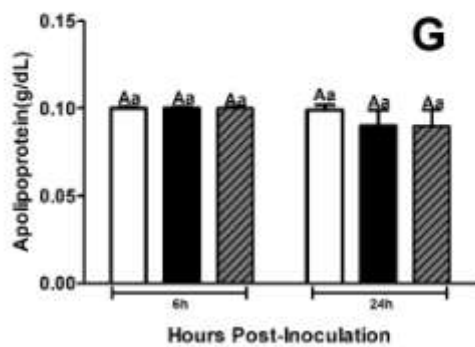
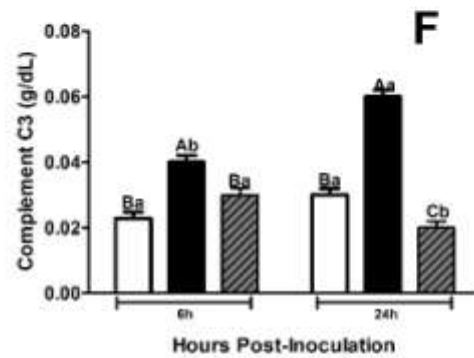
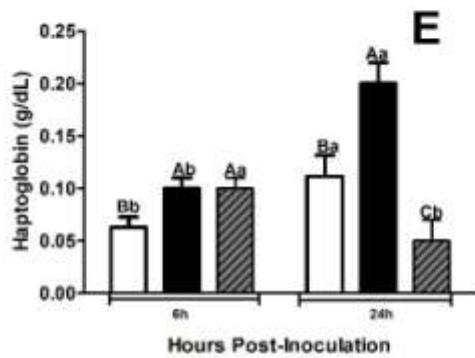
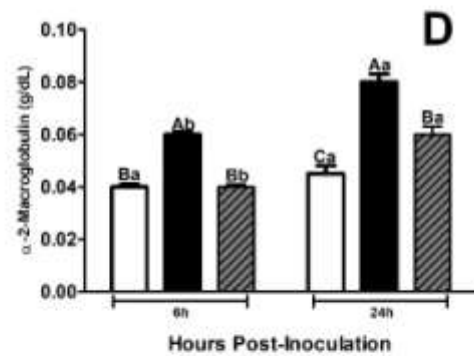
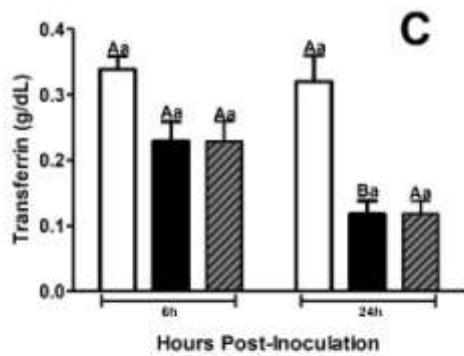
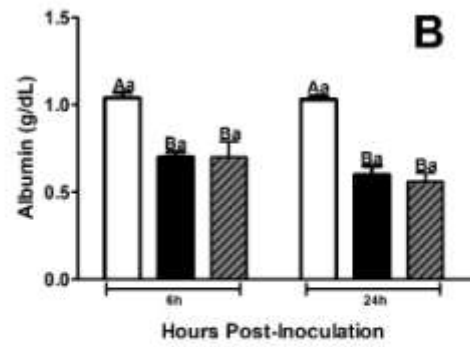
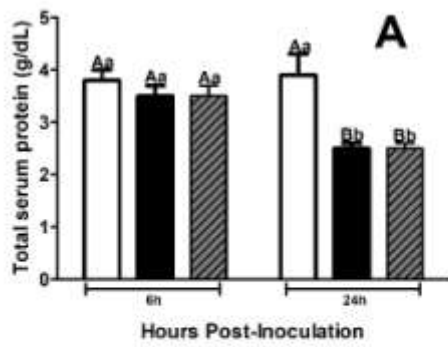
A atividade respiratória dos leucócitos dos peixes injetados com a bactéria foi maior ( $p < 0,05$ ). Todavia, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com CYP e o controle positivo.



**Figura 2.** Valores médios das contagens de leucócitos (A) trombócitos (B) atividade respiratória dos leucócitos (C) do sangue periférico provenientes de tilápias 6 e 24 horas pós-indução. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM de 10 animais em cada grupo. A análise de variância é representada por letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e letras minúsculas entre os tempos. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA + teste post-hoc de Tukey).

### 3.1.2. Proteínas de fase aguda

No presente estudo foram encontrados traços eletroforéticos de 30 frações protéicas por densitometria computadorizada cujos pesos moleculares variaram de 22 a 200 kDa. Os níveis de albumina e transferina mostraram diminuição após o estímulo inflamatório com *A. hydrophila*. A ceruloplasmina,  $\alpha 2$ -macroglobulina e o complemento C3 apresentaram um aumento ao longo do tempo. Na evolução da aerocistite, a tilápia tratada com CYP apresentou diminuição nos valores circulantes de ceruloplasmina, complemento C3,  $\alpha 2$ -macroglobulina e haptoglobina (Figura 3).



Control saline  
*A. hydrophila*  
*A. hydrophila* + CYP 200mg/kg

**Figura 3.** Valores médios das proteínas de fase aguda de tilápias 6 e 24 horas pós-indução. A análise de variância é representada por letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e letras minúsculas entre os tempos. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA + teste post-hoc de Tukey).

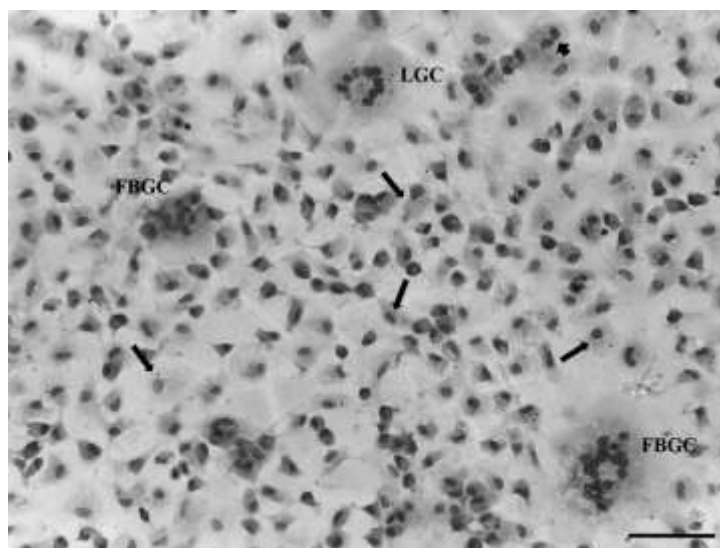
### 3.2. Experimento II – Inflamação crônica

A contagem total de leucócitos presente no sangue periférico do controle positivo foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) 72 HPI em relação aos outros grupos. Após 72h do implante da lamínula, o grupo tratado com CYP apresentou uma redução significativa ( $p > 0,05$ ) dos outros grupos.

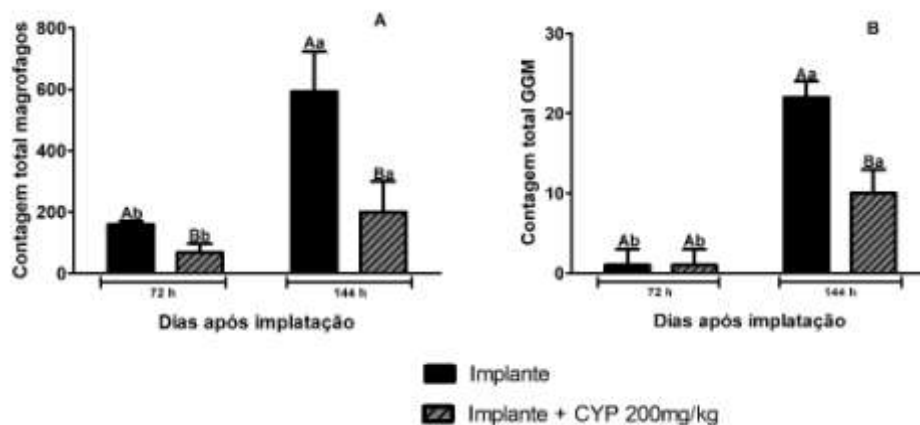
Em relação aos trombócitos, não houve diferença significativa 72 h entre todos os grupos 72h. Entretanto, ao longo do tempo houve uma diminuição da contagem de trombócitos. Na atividade respiratória de leucócitos, foi observado um aumento significativo do Burst com capacidade de produzir radicais reativos de oxigênio nos animais que foram implantados com a lamínula. Ao mesmo tempo, houve diferença ( $p > 0,05$ ) diferença entre o grupo naive com os dois grupos que foram submetidos ao implante.

#### 3.2.1. Implante de lamínula

Em relação à contagem total de macrófagos e células gigantes (Figura 4) após o implante, observou-se aumento no acúmulo de macrófagos e formação de células gigantes ao longo do tempo 144 HPI. Ao mesmo tempo, houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nas contagens totais entre o grupo tratado CYP.



**Figura 4.** Fotomicrografia de célula gigante multinucleada de Langhans (LGC) e macrófagos (M) e formação de corpo estranho (FBGC) 144 horas após o implante em tilapia do Nilo. Hematoxilina & Eosina. Barra = 10  $\mu$ m



**Figura 5.** Valores médios de macrófagos totais (A) e células gigantes (B) 72 e 144 horas pós-implantação. A análise de variância é representada por letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e letras minúsculas entre os tempos. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA + teste post-hoc de Tukey).

#### 4. DISCUSSÃO

O interesse pelo estudo dos eventos inflamatórios aumentou consideravelmente nos últimos anos. Várias pesquisas tem utilizado peixes como modelo experimental para estudar doenças inflamatórias em humanos (Wertman et al., 2016, Dang et al., 2016a, Dang et al., 2016b, MacRae et al., 2015).

No presente estudo, nossa abordagem proteômica permitiu mensurar as alterações das frações protéicas relacionadas com a resposta inflamatória de fase aguda em peixes e identificamos varias proteínas que exercem papéis fundamentais na resposta imune do organismo, entre elas ceruloplasmina, complemento C3,  $\alpha$ 2-macroglobulina, transferrina, haptoglobina e apolipoproteína A1. De forma semelhante aos mamíferos, a tilapia inoculada com *A. hydrophila* apresentou aumento de APPs “positivas” tais como a ceruloplasmina,  $\alpha$ 2-macroglobulina e complemento C3 e diminuição na quantidade de APPs “negativas” como a albumina e transferrina quando comparada aos animais controle positivo, mostrando claramente essas respostas. Assim, podemos sugerir que o perfil da modulação das APPs em tilápias durante a enfermidade infecciosa foi semelhante ao observado em mamíferos, demonstrando o potencial deste modelo experimental.

Em estudo realizado por Chiarla et al. (2008) reportaram que em humanos, os níveis de ceruloplasmina aumenta como parte da resposta de fase aguda na síndrome inflamatória sistêmica “sepsis”. Da mesma forma, a resposta sistêmica contra bactérias invasoras ativa o sistema complemento (C3) na sepsis em humanos (Sungurtekin et al. 2006). A proteína multifuncional de fase aguda de alto peso molecular  $\alpha$ 2-macroglobulina (95 a 115 kDa/SDS-PAGE) (Somnuk et al., 2012). De acordo com Ponprateep et al., (2017) reportaram que a  $\alpha$ 2-macroglobulina é altamente modulada após inflamação, por estar envolvida em várias vias imunológicas como o sistema de coagulação do sangue, fagocitose e melanização. Assim, com os achados do presente estudo, podemos correlacionar a diminuição da contagem total de trombócitos no sangue e o aumento da expressão da proteína de fase aguda, demonstrando várias evidentes da ligação entre a  $\alpha$ 2-macroglobulina com o sistema de coagulação do sangue como sugeridos por Ponprateep et al. (2017), onde também relataram que essa proteína de fase aguda apresenta potente efeito na inibição da cascata de coagulação no sangue consequentemente ocasionando diminuição de trombocitos circulantes.

Em relação aos achados de ceruloplasmina, podemos inferir que, no início do estímulo, o organismo sintetizou um grande quantidade dessa proteína para proteger o organismo dos compostos gerados pela fagocitose e, 24 horas após, essa proteína reduziu drasticamente. Entre as proteínas, a ceruloplasmina é uma glicoproteína ( $\alpha$ -1) liberada na corrente sanguínea imediatamente após a instalação do processo inflamatório (Kogika et al., 2003). No presente estudo, ocorreu uma redução nos níveis de albumina e transferrina em animais com inflamação com objetivo inibir o crescimento bacteriano por quelação de ferro disponível, essencial para a manutenção da bactérias (Thomas, 2000). Além disso, o aumento da haptoglobina colabora com o transporte das células do sistema fagocítico mononuclear, de modo que haja recuperação do íon ferro durante o processo de infecção e defesa contra microrganismos (Thomas, 2000).

Em humanos, após uma infecção bacteriana sistêmica ocorre importante desregulação na coagulação ficando totalmente desordenada (Cohen, 2002). Semelhantes aos observado neste estudo, a trombocitopenia evidente associado com uma leucopenia nos animais infectados, quando comparados ao grupo controle negativo. Esse achados, podem ser explicadas pelo recrutamento de células de defesa para o foco da inflamação. No entanto, os leucócitos e trombocitos que circulam no



sangue são recrutados para a região agredida por uma série de etapas sequenciais sobrepostas mediadas por quimiocinas e integrinas (Luster, 2005).

Nagasawa et al. (2014) e Claudiano et al. (2013) verificaram efeitos semelhantes em outros peixes teleosteos, demonstrando claramente a importância dos trombócitos na fase inicial da resposta inflamatória. Segundo estes autores, diferentemente das plaquetas nos mamíferos, os trombócitos de peixes teleosteos apresentam, além da atividade no processo de coagulação sanguínea, importante papel na imunidade inata. Apesar da controvérsia na literatura, alguns autores acreditam que os trombócitos dos peixes teleosteos apresentam inclusive capacidade fagocítica (Tavares-Dias et al., 2007; Nagasawa et al. 2014).

No presente estudo, a inflamação aguda foi induzida por *A. hydrophila* que estimulou a migração celular para o foco inflamatório, tendo aumento significativo com as células predominantes no foco inflamado. Após a infecção, observou-se nos animais tratados com CYP menores valores no acúmulo de células inflamatórias. A ciclofosfamida inibiu a migração de células inflamatórias para o exsudato desencadeada pela resposta aguda causada por *A. hydrophila*. Podemos inferir que a CYP apresentou um potente efeito imunossupressor na resposta inflamatória em tilápia-do-Nilo, efeito também observado por Kumari & Sahoo (2005), quando trataram *C. Batrachus* com CYP e desafiados com *A. hydrophila*. Entretanto, Chen et al.(1983) utilizaram três doses de 60 mg/kg de CYP e não observaram efeito imunossupressor talvez pela dose que não foi suficiente para causar a redução de células de defesas circulantes. Outros estudos mostraram efeito imunossupressor em peixes com doses acima de 200 mg/kg (Stave et al., 1983; Kitao & Yoshida, 1986; Kumari & Sahoo, 2005).

No entanto, os peixes tratados com CYP apresentaram diminuição na contagem de leucócitos e trombócitos. Possivelmente, a CYP inibiu a formação de células no rim cranial e baço (Hickman-Davis et al., 2010). Com isso apresentavam uma quantidade reduzida de células circulantes. Em humanos, a administração de CYP promove a redução de leucócitos e trombócitos circulante semelhantes aos achados do presente estudo. Além disso, todos estes efeitos são altamente dependentes da dose (Ahlmann & Hempel, 2016). Reduzindo os leucocitos circulates, colabora com prognostico dos pacientes. Em roedores, a inibição no recrutamento de leucocitos ajuda na proteção do organismo contra a síndrome inflamatória sistêmica bacteriana e contra o choque séptico por neutralização do fator inibidor da migração de macrófagos, nesse estudo, os

autores indentificaram um novo alvo para a intervenção terapêutica usando um anticorpo contra o MIF (Calandra et al. 2000).

Os leucócitos, de modo geral, produzem grande quantidade de ROS durante a fagocitose, tanto no estudo agudo como no crônico e os peixes infectados apresentam maiores níveis de ROS. De acordo com Biller-Takahashi et al. (2013), o aumento de ROS indica que os fagócitos aumentaram a atividade fagocítica ativando a enzima NADPH oxidase que produz peróxido de oxigênio. Outros estudos demonstraram aumento do ROS em *O. mossambicus* com a transferência de peixe de condições de hipo-osmolaridade para hiperosmolalidade (Jiang et al., 2008).

Em relação ao implante da lamínula, observou-se aumento significativo na migração de macrófagos e formação de células gigantes após o implante, mas houve diferença significativa entre os grupos implantados. Estes resultados podem ser explicados pela migração de células sanguíneas para o local da inflamação como um mecanismo de defesa. Após o dano tecidual, ocorre a desgranulação de mastócitos com liberação de citocinas e quimiocinas na modulação da permeabilidade vascular, aumentando o recrutamento das células de defesa para o local da inflamação (Luster, 2005). No presente estudo, a CYP influenciou a migração de células para região do implante da lamínula. Para Luster et al. (2005), o controle dessa migração celular é uma estratégia mais eficaz para o tratamento de uma série de doenças inflamatórias. Além disso, em estudo anterior, sugerimos que teleósteos apresentam resposta semelhante à observada em mamíferos, confirmando sua importância para estudos de reação inflamatória (Manrique et al., 2015).

## **5.CONCLUSÃO**

O uso de *Oreochromis niloticus* como modelo experimental para o estudo da inflamação aguda e crônica apresenta respostas semelhantes às observadas em humanos, confirmando sua importância para futuros estudos sobre doenças. O uso de 200 mg/kg de ciclofosfamida em *O. niloticus*, inibe a resposta inflamatória e induz leucopenia e trombocitopenia em processos inflamatórios agudos e crônicos.

## 6. REFERÊNCIAS

- Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Saita, M. V., Gimbo, R. Y., & Urbinati, E. C. (2013). Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, 73(2), 425-429
- Belo, M. A. D. A., Moraes, J. R. E. D., Soares, V. E., Martins, M. L., Brum, C. D., & Moraes, F. R. D. (2012). Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47(7), 1015-1021.
- Brugman, S., & Nieuwenhuis, E. E. (2017). Oxazolone-Induced Intestinal Inflammation in Adult Zebrafish. *Inflammation: Methods and Protocols*, 311-318.
- Carneiro, P. C. F., & Urbinati, E. C. (2001a). Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, 32(4), 297-304
- Castro, M. P., Claudiano, G. S., Petrillo, T. R., Shimada, M. T., Belo, M. A., Marzocchi-Machado, C. M., & Moraes, F. R. (2014). Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbocholate and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fish & shellfish immunology**, 36(1), 284-290
- Carneiro, P.C.F., & Urbinati, E.C. (2001b). Electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* following transport stress under benzocaine effect. **Journal of Applied Aquaculture**, 11: 1-13.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Le Roy, D., Pugin, J., Metz, C. N., Hültner, L., ... & Glauser, M. P. (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. **Nature medicine**, 6(2), 164
- Conrad, D. M., Hoskin, D. W., Liwski, R., & Naugler, C. (2016). A re-examination of the role of the acute phase protein response in innate cancer defence. **Medical hypotheses**, 93, 93-96
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, 420(6917), 885.
- Chiarla, C., Giovannini, I., & Siegel, J. H. (2008). Patterns of correlation of plasma ceruloplasmin in sepsis. **Journal of Surgical Research**, 144(1), 107-110
- De Jonge, M. E., Huitema, A. D., Holtkamp, M. J., Van Dam, S. M., Beijnen, J. H., & Rodenhuis, S. (2005). Aprepitant inhibits cyclophosphamide bioactivation and thiotepa metabolism. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, 56(4), 370-378.
- Wójcik, R., & Dabkowska, A. (2010). The effect of cyclophosphamide on the selected parameters of immunity in rats. **Central European Journal of Immunology**, 35, 1-9.

Mullins, D. W., & Alexander, M. P. (2017). Cyclophosphamide preconditioning facilitates autoimmune vitiligo and enhanced antitumor efficacy following vaccination with activated dendritic cells. **The Journal Immunology**, 198 (1 Supplement) 204.12.

Sekiguchi, N., Nishina, S., Kawakami, T., Sakai, H., Senoo, N., Senoo, Y., ... & Ishida, F. (2017). Oral cyclophosphamide was effective for Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia in CD16+ CD56- chronic lymphoproliferative disorder of NK-cells. **International journal of hematology**, 105(6), 854-858.

Yunyun, F., Yu, C., Panpan, Z., Hua, C., Di, W., Lidan, Z., ... & Yan, Z. (2017). Efficacy of Cyclophosphamide treatment for immunoglobulin G4-related disease with addition of glucocorticoids. **Scientific Reports**, 7

Papadopoulos, M. C., Abel, P. M., Agranoff, D., Stich, A., Tarelli, E., Bell, B. A., ... & Krishna, S. (2004). A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis. **The Lancet**, 363(9418), 1358-1363.

Pucci-Minafra I, Fontana S, Cancemi P, Alaimo G, Minafra S (2002) Proteomic patterns of cultured breast cancer cells and epithelial mammary cells. **Ann N Y Acad Sci** 963: 122–139.I.

Buhimschi, C. S., Bhandari, V., Hamar, B. D., Bahtiyar, M. O., Zhao, G., Sfakianaki, A. K., & Paidas, M. (2007). Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis. **PLoS medicine**, 4(1), e18.

Ghobadi, E., Moloudizargari, M., Asghari, M. H., & Abdollahi, M. (2017). The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, 13(5), 525-536

Vernet, P., Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and cellular endocrinology**, 216(1), 31-39.

MacRae MA, Peterson RT. (2015) Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discover**, 14(10), 721-31.

Huang, S. Y., Feng, C. W., Hung, H. C., Chakraborty, C., Chen, C. H., Chen, W. F., ... & Wu, C. Y. (2014). A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. **PloS one**, 9(8), e104414

Wu, N., Song, Y. L., Wang, B., Zhang, X. Y., Zhang, X. J., Wang, Y. L., ... & Zhang, Y. A. (2016). Fish gut-liver immunity during homeostasis or inflammation revealed by integrative transcriptome and proteome studies. **Scientific reports**, 6, 36048

Howe, D. G., Bradford, Y. M., Eagle, A., Fashena, D., Frazer, K., Kalita, P., ... & Pich, C. (2017). The Zebrafish Model Organism Database: new support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching. **Nucleic acids research**, 45(D1), D758-D768.

- Witten, P. E., Harris, M. P., Huysseune, A., & Winkler, C. (2017). Small teleost fish provide new insights into human skeletal diseases. **Methods in Cell Biology**, 138, 321-346
- Liu, J., Zhou, Y., Qi, X., Chen, J., Chen, W., Qiu, G., & Wu, N. (2017). CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling. *Human genetics*, 1-12.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F. R. (2003). Haematological evaluation of *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Ostrichthyes: Cichlidae) captured in a free fishing farm in Franca São Paulo State, Brazil. **Bioscience Journal**, 19: 103-110
- Natt, M.P. and Herrick, C.A. (1952). A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, 31: 735-738.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259), 680-685
- Niessen, S., Mcleod, I., & Yates, J. R. (2006). Silver staining, digestion, and extraction of peptides from an acrylamide gel for MS analysis. **Cold Spring Harbor Protocols**, (7), pdb-prot4661
- Petric, M. C., Martins, M. L., Onaka, E. M., Moraes, J. D., Moraes, F. D., & Malheiros, E. B. (2003). Suplementação alimentar com vitamina C potencializa a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, 29(1), 69-76
- Wertman, J., Veinotte, C. J., Dellaire, G., & Berman, J. N. (2016). The zebrafish xenograft platform: evolution of a novel cancer model and preclinical screening tool. In *Cancer and Zebrafish* (pp. 289-314). Springer International Publishing.
- Dang, M., Henderson, R. E., Garraway, L. A., & Zon, L. I. (2016). Long-term drug administration in the adult zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. **Disease models & mechanisms**, 9(7), 811-820.
- Dang, M., Fogley, R., & Zon, L. I. (2016). Identifying novel cancer therapies using chemical genetics and zebrafish. In *Cancer and Zebrafish* (pp. 103-124). Springer International Publishing
- Roy, S., Kumar, V., Kumar, V., & Behera, B. K. (2017). Acute Phase Proteins and their Potential Role as an Indicator for Fish Health and in Diagnosis of Fish Diseases. **Protein and peptide letters**, 24(1), 78-89.
- Gabay, C., & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England journal of medicine**, 340(6), 448-454
- Sungurtekin, H., Sungurtekin, U., & Balci, C. (2006). Circulating complement (C3 and C4) for differentiation of SIRS from sepsis. **Advances in therapy**, 23(6), 893-901.

Kogika, M. M., Pereira, D. A., Elias, F., Notomi, M. K., Delayte, E. H., Kawahara, R., & Hagiwara, M. K. (2003). Determination of serum haptoglobin, ceruloplasmin and acid alpha-glycoprotein in dogs with haemorrhagic gastroenteritis. **Ciência Rural**, 33(3), 513-517

Thomas, J. S. Overview of plasma proteins in Schalm's veterinary hematology (ed. Feldman, B.F. et al.) 891-898 (Philadelphia: Lippincott, 2000).

Luster, A. D., Alon, R., & von Andrian, U. H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature immunology**, 6(12), 1182

Chen, M. F., Rohovec, J. S., & Fryer, J. L. (1983). Effect of methotrexate, kenalog, and cyclophosphamide on the antibody response of steelheads to *Aeromonas salmonicida*. **Transactions of the American Fisheries Society**, 112(4), 561-564

Nagasawa, T., Nakayasu, C., Rieger, A. M., Barreda, D. R., Somamoto, T., & Nakao, M. (2014). Phagocytosis by thrombocytes is a conserved innate immune mechanism in lower vertebrates. **Frontiers in immunology**, 5

Manrique, W. G., da Silva Claudiano, G., de Castro, M. P., Petrillo, T. R., Figueiredo, M. A. P., de Andrade Belo, M. A., & de Moraes, F. R. (2015). Expression of cellular components in granulomatous inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus* Model. **PloS one**, 10(3), e0121625.

# CAPÍTULO IV

---

## 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na importância do desenvolvimento de novos modelos experimentais associados às vantagens de estudar os diferentes eventos da resposta inflamatória, tem-se proposto o uso de várias espécies animais, dentre elas, os peixes teleósteos. Em estudos recentes consideram uma ferramenta bastante promissora o uso de peixes como modelo experimental, sendo uma alternativa ao uso de roedores.

No presente estudo, a tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*), demonstrou ser um excelente modelo experimental para estudo da aerocistite aguda, permitindo avaliar a cinética de migração e acúmulo celular no sítio inflamado. Além disso, os achados desta investigação demonstram a viabilidade do modelo experimental com implante de lamínula de vidro em *O. niloticus* para estudo da reação inflamatória crônica tipo corpo estranho, permitindo avaliar tanto a cinética de acúmulo de macrófagos como a formação de células policariontes. Desta forma, os modelos experimentais agudo e crônico em peixes são promissores e permitirá investigações que busquem avaliar e diferenciar tipos de estímulos moduladores do sistema imune.

Semelhantemente aos mamíferos, as tilápias com infecção bacteriana apresentaram diminuição nas quantidades de albumina e transferrina quando comparadas aos animais controle, além de apresentar um aumento na ceruloplasmina, macroglobulina  $\alpha_2$  e complemento C3, demonstrando que o perfil da resposta das APPs nestas espécies durante a doença infecciosa, é semelhante ao observado em mamíferos.

O uso de 200 mg/kg de ciclofosfamida em *O. niloticus*, inibe a resposta inflamatória e induz a leucopenia e trombocitopenia em processos inflamatórios agudos e crônicos.