

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

**INSULINA E DEXAMETASONA NA AEROCISTITE AGUDA
INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO
NILO, *Oreochromis niloticus*, ALOXANO-DIABÉTICAS**

Ed Johnny da Rosa Prado

Medico Veterinário

Jaboticabal - São Paulo – Brasil

2014

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

**INSULINA E DEXAMETASONA NA AEROCISTITE AGUDA
INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO
NILO, *Oreochromis niloticus*, ALOXANO-DIABÉTICAS**

Ed Johnny da Rosa Prado

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciência Agrárias e Veterinária – Unesp,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de mestre
em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

2014

P896i Prado, Ed Johnny da Rosa
Insulina e dexametasona na aerocistite aguda induzida por
Aeromonas hydrophila em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*,
aloxano-diabéticas / Ed Johnny da Rosa Prado. -- Jaboticabal, 2014
xxiv, 78 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Marco Antonio de Andrade Belo
Banca examinadora: Claudinei da Cruz, Eduardo Makoto Onaka
Bibliografia

1. *Oreochromis niloticus*. 2. Inflamação aguda. 3. Diabétes. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.37:639.31

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

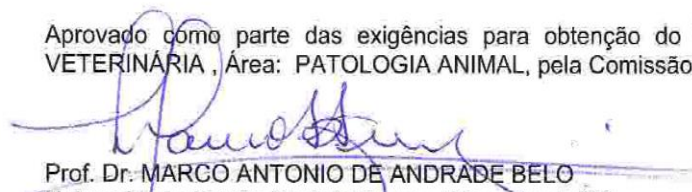
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INSULINA E DEXAMETASONA NA AEROCISTITE AGUDA INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO, *Oreochromis niloticus*, ALOXANO-DIABÉTICAS

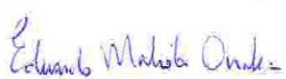
AUTOR: ED JOHNNY DA ROSA PRADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

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


Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Universidade Camilo Castelo Branco / Descalvado/SP


Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ
Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos / Barretos/SP


Prof. Dr. EDUARDO MAKOTO ONAKA
Instituto de Pesca / São José do Rio Preto/SP

Data da realização: 14 de janeiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ED JOHNNY DA ROSA PRADO – Natural de Moji das Cruzes – SP, nascido em 10 de janeiro de 1986, Médico Veterinário, mestrando em patologia veterinária e Técnico agrícola. Iniciou o curso técnico agrícola juntamente ao ensino médio na instituição Centro Paula Souza, Espírito Santo do Pinhal - SP o ano 2002, tendo concluído o mesmo no ano de 2004. Em 2005, participou do primeiro e segundo módulo em técnico agropecuário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Ingressou em 2006 no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO, Campus Descalvado (SP), concluindo a graduação no ano de 2010. No período de graduação exerceu atividades de pesquisa junto ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal da UNICASTELO, obtendo por dois anos consecutivos bolsa de pesquisa do Programa Institucional Pró-inicial (2008 e 2009), atuando na área de fisiopatologia da reação inflamatória em peixes teleósteos. Atualmente, mestrando pelo Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Jaboticabal, SP e bolsista pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP-Nº2011/16945-9), exercendo atividades de pesquisa junto ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal da UNICASTELO, participando do Group of Animal Pharmacology (GAP).

*É preciso amar as pescas
Como se não houvesse amanhã
Porque se você parar pra pensar,
Na verdade não há.*

(Renato Russo / Dado Villa-Lobos / Marcelo Bonfá)

Ao

Antonio Pascoal Zampieri

DEDICO

À

Alessandra Cristina de Moraes

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar a *DEUS*, por ter me dado à oportunidade da evolução espiritual.

- As vidas, pois sem elas este estudo não poderia ser realizado e espero que as mesma tenham cumprido sua missão aqui na terra.

- Ao Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo por me acompanhar nesta caminhada com seu espírito inovador, me orientando e incentivando a pesquisa, tendo grandes oportunidades de participação em publicações e eventos que contribuíam ainda mais para o meu crescimento profissional.

- À minha esposa Alessandra Cristina de Moraes, pela dedicação ao longo deste estudo como se o mesmo fosse responsabilidade dela.

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa (processo FAPESP Nº 2011/16945-9) e financiamento (processo FAPESP Nº 2012/12256-7) do projeto de pesquisa.

- À piscicultura Pirajuba, em especial à amizade de Elizabeth Prada Foz (Betina) por me acolher na sua casa e fornecer a infraestrutura necessária para realização deste projeto de pesquisa.

- Aos colegas Roberto e Vanessa, os quais foram uma fonte constante de auxílios e idéias.

- E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	02
2.1 Gerais.....	02
2.2 Especificos.....	02
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3.1 Inflamação em Teleósteos.....	03
3.2 Insulina em peixes teleósteos.....	04
3.3 Aloxano em peixes teleósteos.....	06
3.4 Anti-inflamatório esteroidal em peixes teleósteos.....	07
3.5 <i>Aeromonas hydrophila</i>	08
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Animais e acondicionamento.....	10
4.2 Delineamento experimental.....	11
4.3 Anestesia dos peixes.....	12
4.4 Metodologia empregada no isolamento de <i>Aeromonas hydrophila</i>	12
4.4.1 Isolamento das colônias do gênero <i>Aeromonas</i>	12
4.4.2 Identificação da espécie <i>Aeromonas hydrophila</i>	13
4.5 Preparação do inóculo bacteriano.....	15
4.6 Indução do processo inflamatório.....	16
4.7 Administração do Aloxano.....	16
4.8 Administração de dexametasona e insulina.....	17
4.9 Obtenção e avaliação do exsudato da bexiga natatória.....	18
4.10 Avaliação do hemograma.....	20
4.11 Avaliação do bioquímico sérico.....	21
4.12 Avaliação morfométrica e histopatológica dos órgãos.....	21
4.13 Estatística utilizada para avaliação dos resultados.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1 Avaliação do acúmulo celular na aerocistite.....	23
5.2 Avaliação do hemograma na aerocistite.....	26

5.2.1 Leucograma.....	26
5.2.2 Trombograma.....	29
5.2.3 Estudo eritrocitário.....	30
5.3 Avaliação bioquímica.....	32
5.4 Estudo do índice hepático, esplênico e renal somático.....	36
5.5 Avaliação do histopatológico.....	39
5.6 Estudo clínico e patológico em tilápias aloxano-diabéticas.....	50
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 022546/11 do trabalho de pesquisa intitulado **"Estudo da participação da insulina e do efeito glicocorticóide exógeno sobre a resposta inflamatória aguda de tilápias do Nilo, *Oreochomis niloticus*, desafiadas com *Aeromonas hydrophila*"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião extraordinária de 18 de novembro de 2011.

Jaboticabal, 21 de novembro de 2011.


Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Presidente - CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

A	– Aloxano
A+D	– Aloxano e dexametasona
A+D+I	– Aloxano, dexametasona e insulina
A+I	– Aloxano e insulina
C.P	– Controle positivo
C.N	– Controle negativo, animais que receberam solução salina
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	– Concentração de hemoglobina corpuscular média
COBEA	– Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	– Cicloxigenase ₂
CREBIO	– Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica
D	– Dexametasona
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	– Grama
g-L ⁻¹	– Grama por litro
GLM	– General Linear Model
Glut-2	– Transportador de glicose tipo 2
gm-dL ⁻¹	– Grama por decilitro
GH	– Hormônio do crescimento
HE	– Hematoxilina eosina
HPI	– Horas após inóculo
HCL	– Ácido clorídrico
HPI	– Horas após inóculo
I+D	– Insulina e dexametasona
I	– Insulina
IGF1	– Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF2	– Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IL-1	– Interleucina-1
IL-6	– Interleucina-6

IL-10	– Interleucina-10
ILPs	– Peptídeos semelhante a insulina
iNOS	– Óxido nítrico sintase induzível
INS	– Insulina
KCl	– Cloreto de potássio
L	– Litros
L/min	– Litros por minuto
LPS	– Lipopolissacarídeo
mg-L ⁻¹	– Miligrama por litro
mg-kg ⁻¹	– Miligrama por quilograma
MgSO ₄	– Sulfato de magnésio
mL	– Mililitro
mm	– Milímetro
mM	– Massa molecular
NaCl	– Cloreto de sódio
NEPEAM	– Núcleo de Estudo e Pesquisas Ambientais em Matologia
ng	– Nanograma
ng-μL ⁻¹	– Nanograma por microlitro
NO	– Óxido nítrico
n°	– Número
O ₂	– Oxigênio
PAMPs	– Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	– Tampão Salina Fosfato
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
PMM	– Polimorfonucleares
PRR	– Receptores de reconhecimento de padrão
pH	– Potencial hidrogeniônico
rDNA	– Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RNA _m	– Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	– Espécie reativa de oxigênio
rpm	– Rotação por minuto
SP	– São Paulo

TLR	– Receptores do tipo Toll
TNF- α	– Fator de necrose tumoral alfa
TSA	– Tripticase-soja em ágar
TSB	– Tripticase-soja em calda
TSI	– Tríplice açúcar ferro
UFC	– Unidades formadoras de colônia
UI-kg ⁻¹	– Unidade internacional por quilograma
UNESP	– Universidade Estadual Paulista
VCM	– Volume corpuscular médio
YSI	– Incorporated Yellow Springs

LISTA DE SIMBOLOS

®	– Marca registrada
°C	– Graus Celsius
%	– Porcentagem
μ	– Micras
±	– Maior ou menor
α	– Alfa
β	– Beta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e os respectivos desvios-padrão observados para a avaliação do pH, condutividade elétrica, temperatura e oxigênio dissolvido na água dos tanques durante o período experimental.....	11
Tabela 2 - Distribuição de animais nos diferentes tratamentos para estudo da inflamação aguda.....	11
Tabela 3 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de eritrócitos, percentual de hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média de tilápias, <i>O. niloticus</i> , após estímulo inflamatório por <i>A. hydrophila</i> na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura	1 - Caixas d'agua para acondicionamento dos peixes.....	10
Figura	2 - Comparação genética da cepa do gênero <i>Aeromonas</i> no GenBank.....	15
Figura	3 - Inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> na região dorso lateral esquerdo, ao final do opérculo.....	16
Figura	4 - Aplicação de aloxano via endovenosa em vaso caudal.....	17
Figura	5 - Administração de dexametasona via intramuscular na região dorso lateral esquerda.....	17
Figura	6 - Administração de insulina via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda.....	18
Figura	7 - Exposição da bexiga natatória.....	19
Figura	8 - Avaliação do acúmulo de células totais em câmara de Neubauer.....	19
Figura	9 - Contagem dos diferentes tipos celulares em exsudato obtidos da aerocistite induzido em tilápias. Extensão do exsudato, macrófago (A, seta preta), neutrófilos (A,B, setas vermelhas), trombócitos (B, seta preta) e linfócito (C). Células foram coradas com corante "May-Grunwald-Giemsa-Wright". Barra= 5µm.....	19
Figura	10 - Punção de vaso caudal.....	20
Figura	11 - Contagem direta de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer.....	20
Figura	12 - Contagem de trombócitos e diferencial leucocitário no sangue de tilápias. Neutrófilo próximo ao centro (A). Monócito próximo ao centro (B). Seta preta mostra trombócito e seta vermelha mostra linfócito (C). Células foram coradas com corante "May-Grunwald-Giemsa-Wright". Barra= 5µm.....	21
Figura	13 - Órgãos coletados: fígado (A); rim, porção cranial (B); baço (C); rim, porção caudal (D); músculo esquelético (E); globo ocular (F); brânquia (G).....	22
Figura	14 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de neutrófilo em exsudato proveniente do estímulo inflamatório por <i>Aeromonas hydrophila</i> na bexiga natatória de <i>Oreochromis niloticus</i> em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.....	24

- Figura 15 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de linfócitos em exsudato proveniente do estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 25
- Figura 16 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de trombócitos em exsudato proveniente do estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 25
- Figura 17 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de macrófagos em exsudato proveniente do estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 26
- Figura 18 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de neutrófilo no sangue de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 27
- Figura 19 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de linfócitos no sangue de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 28

- Figura 20 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de monócitos no sangue de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 29
- Figura 21 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de trombócitos no sangue de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 30
- Figura 22 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio da glicemia de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 32
- Figura 23 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de triglicérides em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 33
- Figura 24 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de colesterol em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 34

- Figura 25 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de fosfatase alcalina em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 34
- Figura 26 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de proteína total em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 35
- Figura 27 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de albumina em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0012..... 36
- Figura 28 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio da relação hepato-somático de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 37
- Figura 29 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio da relação espleno-somático de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001..... 38

- Figura 30 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio da relação renal da porção cranial-somático de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina (C. N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr> F <.0001..... 39
- Figura 31 - Fotomicrografia da bexiga natatória em tilápias induzida aerocistite por solução salina 6 horas após inóculo (A - Barra= 100µm e B - Barra= 10µm); tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (C - Barra= 100µm e D - Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com dexametasona 6 horas após inóculo (E - Barra= 100µm e F - Barra= 10µm). Membrana serosa (seta) e lado interno (asterisco). Coloração HE..... 40
- Figura 32 - Fotomicrografia da bexiga natatória em tilápias induzida aerocistite por solução salina 48 horas após inóculo (A - Barra= 100µm e B - Barra= 10µm); tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* 48 horas após inóculo (C - Barra= 100µm e D - Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com dexametasona 48 horas após inóculo (E - Barra= 100µm e F - Barra= 10µm). Membrana serosa (seta) e lado interno (asterisco). Coloração HE..... 42
- Figura 33 - Fotomicrografia da bexiga natatória em tilápias aloxano-diabéticas induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (A - Barra= 100µm e B - Barra= 10µm); tilápias aloxano-diabéticas induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com insulina 6 horas após inóculo (C - Barra= 100µm e D - Barra=10µm). Membrana serosa (seta) e lado interno (asterisco). Coloração HE..... 43
- Figura 34 - Fotomicrografia da porção cranial renal em tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (A - Barra= 50µm e B - Barra= 10µm); tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com insulina 6 horas após inóculo (C - Barra= 50µm e D - Barra= 10µm). Coloração HE..... 44
- Figura 35 - Fotomicrografia hepática em tilápias aloxano-diabéticas induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (A - Barra= 50µm e B - Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (C - Barra= 50µm e D - Barra= 10µm). Coloração HE..... 45

Figura	36 - Fotomicrografia hepática em tilápias induzida aerocistite 48 HPI. Tilápias induzida aerocistite por solução salina (A - Barra= 50µm e B - Barra= 10µm), tilápias induzida aerocistite por <i>A. hydrophila</i> (C - Barra= 50µm e D - Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por <i>A. hydrophila</i> e tratadas com insulina (E - Barra= 50µm e F - Barra= 10µm). Coloração HE.....	46
Figura	37 - Fotomicrografia de brânquias em tilápias induzida aerocistite 24 HPI. Tilápias induzida aerocistite por solução salina (A - Barra= 50µm e B - Barra= 10µm), tilápias induzida aerocistite por <i>A. hydrophila</i> (C - Barra= 50µm e D - Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por <i>A. hydrophila</i> e tratadas com insulina (E - Barra= 50µm e F - Barra= 10µm). Coloração HE.....	48
Figura	38 - Fotomicrografia do músculo esquelético (ME) de tilápia normal (A - Barra= 100µm e B - Barra= 5µm); tilápia aloxano-diabética (C - Barra= 100µm, D - Barra= 50µm, E - Barra= 10µm) e tilápia aloxano-diabética tratado com dexametasona (F - Barra= 100µm e G - Barra= 10µm). Tegumento (seta preta) e subcutâneo (seta vermelha). Coloração HE.....	49
Figura	39 - Alteração hepática em tilápias aloxano-diabéticas 24 horas após indução.....	50
Figura	40 - Alterações do globo ocular em tilápias aloxano-diabéticas 3 dias após indução.....	50
Figura	41 - Perda da musculatura esquelética em tilápias aloxano-diabéticas 2 semanas após indução (A e B).....	50

INSULINA E DEXAMETASONA NA AEROCISTITE AGUDA INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO, *Oreochromis niloticus*, ALOXANO-DIABÉTICAS

RESUMO - Na avaliação da participação da insulina e dos efeitos da dexametasona sobre a resposta de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, durante aerocistite induzida por *Aeromonas hydrophila*, foram utilizadas 189 tilápias com peso médio 532g (\pm 74g), constituindo nove tratamentos: Não tratado e Não inoculado (controle); Não tratado e inoculado; Tratado com insulina (INS) e inoculado; Tratado com INS + Aloxano (ALOX) e inoculado; Tratado com insulina (INS)+ dexametasona (DEXA) e inoculado; Tratado com ALOX e inoculado; Tratado com ALOX + DEXA e inoculado; Tratado DEXA e inoculado; Tratados com INS + ALOX + DEXA e inoculado. Após, seis, 24 e 48 horas após inóculo (HPI), as tilápias foram submetidas à anestesia profunda para colheita de sangue para determinação do hemograma completo e bioquímico sérico, assim como, obtenção de exsudato. Da mesma forma, foram realizados estudos dos índices somáticos hepáticos, esplênicos e renais, além do histopatológico destes mesmos órgãos. Contudo, as avaliações na aerocistite infecciosa revelaram o predomínio de neutrófilos no local inflamado, sendo esta alteração mais significativa 24 HPI, apresentando um padrão de inflamação aguda fibrinossupurativa na histopatologia. A neutrofilia apresentou correspondência com as alterações renais na porção cranial, sendo este resultado fortemente influenciado pela tratamento com insulina. O tratamento com dexametasona suprimiu a resposta imune inata das tilápias, resultando em linfopenia e monocitopenia, seguida pela ausência de macrófagos no exsudato durante a evolução da reação inflamatória infecciosa. Hiperglicemia e hipercolesterolemia em tilápias tratadas com dexametasona confirmaram o efeito glicocorticoide sobre o metabolismo intermediário dos peixes. A administração de aloxano resultou em alterações clínico-patológicos no globo ocular, tecido hepático e tecido muscular esquelético, acompanhado de aumento dos valores de glicose, triglicerídeos, colesterol e fosfatase alcalina sérica. A histopatologia do tecido tegumentar e da musculatura esquelética de tilápias aloxano-diabéticas revelou aumento da deposição de tecido adiposo no subcutâneo e entre as miofibras, caracterizando também um quadro de rabiólise. Na avaliação da reação inflamatória aguda em tilápias diabéticas, de um modo geral, observou-se comprometimento no controle do sistema imune inato, particularmente na migração de fagócitos para o foco inflamado, evoluindo para uma intensa resposta sistêmica com múltiplas anormalidades nos tecidos branquial, hepático, esplênico, renal (porção cranial), muscular e ocular.

Palavras-chave: Inflamação, aeromonose, glicocorticoide, diabete, peixe teleósteo.

INSULIN AND DEXAMETHASONE ON ACUTE AEROCISTITE INDUCED BY *Aeromonas hydrophila* IN NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus*, ALLOXAN – DIABETIC

ABSTRACT – For assessing the contribution of insulin and the dexamethasone effects on the response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during *Aeromonas hydrophila* induced aerocistite, were used 189 tilapia mean weight 532g (\pm 74g) distributed in nine treatments: Untreated and not inoculated (control); Untreated and inoculated; Treated with insulin (INS) and inoculated; Treated with INS + alloxan (ALOX) and inoculated; Treated with insulin (INS) + dexamethasone (DEXA) and inoculated; Inoculated and treated with ALOX; Treated with ALOX + DEXA and inoculated; DEXA Treated and inoculated; Treated with INS + ALOX + DEXA and inoculated. After six, 24 and 48 hours post inoculation (HPI), tilapia were subjected to deep anesthesia for blood samples collection to determinate of complete blood count and serum biochemistry, as well as for obtaining exudate. Studies of liver, spleen and kidney somatic index were performed, and histopathology study was realized with the same organs. However, the infectious aerocistite revealed a predominance of neutrophils in the inflamed site, which was most significant at 24 HPI, with a pattern of fibrinossuppurative exudate, showing correspondence with renal changes in the cranial portion, principally in fish treated with insulin. The immunosuppressive effect of dexamethasone resulted in lymphopenia and monocytopenia, followed by the absence of macrophages in the exudate during the evolution of infectious inflammatory reaction. Hyperglycemia and hypercholesterolemia in dexamethasone treated tilapia confirmed the glucocorticoid effect on the intermediary metabolism. The administration of alloxan resulted in clinical and pathological changes in eyeball, liver tissue, skeletal muscle tissue, accompanied by increase in the amounts of glucose, triglycerides, cholesterol and serum alkaline phosphatase. The histopathology of cutaneous tissue and skeletal muscle in alloxan-diabetic tilapia revealed increased deposition of adipose tissue in the subcutaneous and between myofibers, resulting in rhabdomyolysis. In the acute inflammatory reaction of diabetic tilapia, generally, was observed impairment in the control of the innate immune system, particularly the migration of phagocytes in the inflamed focus, thus able to evolve a strong systemic response with multiple abnormalities in gill tissue, liver, spleen, kidney (cranial portion), skeletal muscle and eye.

Keywords: inflammation, infectious disease, glucocorticoid, diabetes, teleost fish.

1. INTRODUÇÃO

O primeiro estudo sobre a reação inflamatória em peixe descreveu a atividade fagocítica de células mononucleares (METCHNIKOFF, 1893; 1905). Desde então, vários autores tentam determinar tipos celulares presentes na reação inflamatória induzida por vários tipos de flogógenos, em diversas espécies de peixes e tempos de observação, mostrando que durante a reação inflamatória, o agente fagocítico pode apresentar variações morfológicas, ontogenéticas e em sua cinética (WEINREB, 1958; JANSSON e WAALER, 1967; GRIFFIN et al., 1953; MATUSHIMA e MARIANO, 1996; ENDO et al., 1997; BOZZO et al., 2007; MORAES et al., 2013; CLAUDIANO et al., 2013). A cinética da reação inflamatória é bastante variável entre os diferentes modelos de estudo em animais, assim como há variação em uma mesma espécie quando se altera o estímulo inflamatório (ENDO et al., 1997; SILVA et al., 2007).

A inflamação é a reação do tecido vivo à agressão local, ocorrendo como resposta inespecífica, caracterizada por alterações que tendem a limitar os efeitos lesivos ao organismo, tornando-se um processo modulado no sentido de que sua amplitude varie em função da intensidade do estímulo. Este fenômeno é parte essencial das defesas naturais do indivíduo, além de apresentar participação efetiva no processo de reparação tecidual. Todavia, a inflamação pode ser potencialmente nociva ao organismo como por exemplo no caso de doenças autoimunes (GARCIA LEME, 1989).

Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que antecedem a inflamação, envolvendo mediadores químicos autacóides e moduladores diversos de ação autócrina, parácrina e endócrina e também sobre a mediação da resposta imune não-específica e, tal pouco sobre as interações entre agente infeccioso e a reação inflamatória na patogenia de doença infecciosa nesta classe animal.

Partindo-se da necessidade de compreensão e caracterização de eventos na fisiopatologia da reação inflamatória de tilápias do Nilo, o presente estudo teve por objetivos avaliar a participação da insulina e o efeito da dexametasona sobre a resposta celular na inflamação aguda induzida na bexiga natatória de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), induzidas por *Aeromonas hydrophila*.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

O presente estudo teve por objetivos avaliar a participação da insulina e da dexametasona sobre aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), aloxano-diabéticas.

2.2 Especificos

Avaliar a influência da insulina e da dexametasona em tilápias do Nilo com aerocistite induzida por *Aeromonas hydrophila*, sobre:

- O acúmulo celular no foco inflamado;
- A resposta hematológica;
- A resposta bioquímica sérica;
- Achados encontrados no estudo histopatológico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Inflamação em Teleósteos

Os peixes possuem uma variedade de mecanismos de defesa específicos e não-específicos contra organismos invasores. Com a penetração do agente pelas barreiras físicas do animal, a primeira linha de defesa é o sistema imune não-específico (SARDER et al., 2001). Este mecanismo de proteção é fundamental para os peixes, e constitui-se processo controlado e coordenado, buscando minimizar os danos teciduais e restabelecer condições fisiológicas normais (KIM et al., 2007). Neste contexto, a reação inflamatória em peixes teleósteos, assim como em mamíferos, desenvolve papel importante na defesa do organismo, resultando no recrutamento e acúmulo de leucócitos no sítio lesado.

Matushima e Mariano (1996), ao injetarem carragenina na bexiga natatória de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), caracterizaram pelo exame de extensões do exsudato e microscopia eletrônica, 71 % de trombócitos e 17% de macrófagos, seis horas após a injeção. Utilizando o mesmo modelo de estudo de inflamação em pacus (*Piaractus mesopotamicus*), Martins et al. (2006) encontraram seis horas após a injeção de carragenina, 79% de trombócitos e 31% de macrófagos acompanhados por número pouco expressivo de granulócitos e de linfócitos.

Bozzo et al. (2007) estudaram a composição celular do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória por tioglicolato, *Aeromonas hydrophila* e endotoxina (LPS) de *Escherichia coli*, 6, 24 e 48 horas após os estímulos. Os resultados demonstraram que as células predominantes no foco inflamado foram os trombócitos, acompanhados em menor quantidade de linfócitos, enquanto que macrófagos e granulócitos apresentaram quantidades baixas desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo considerado. O mesmo perfil de acúmulo celular no exsudato inflamatório agudo de tilápia foi observado por Claudiano et al. (2013).

A injeção de LPS na bexiga natatória de tilápias do Nilo causou a formação de exsudato constituído principalmente por neutrófilos (96%) vinte e quatro horas depois da aplicação (ENDO et al., 1997). O acúmulo de granulócitos no exsudato foi

relatado por Moraes et al. (2013) em estímulo por *Aeromonas hydrophila* na mesma espécie de teleósteo.

3.2 Insulina em peixes teleósteos

De acordo com Caruso e Sheridan (2011), os peixes representaram um modelo experimental importante para o estudo das funções pancreáticas. Segundo estes autores, efeitos de extrato de tecidos pancreáticos de peixes sobre o metabolismo de carboidratos vêm sendo estudados desde 1904. Da mesma forma, a insulina de peixes foi uma das primeiras entre os vertebrados a serem isoladas (MCCORNICK; NOBEL, 1924). A insulina (INS) é um hormônio peptídico que apresenta papel biológico fundamental na regulação do crescimento somático, na diferenciação celular e no metabolismo de todos os vertebrados (HERNADEZ-SANCHES et al., 2006). Em peixes este peptídeo participou também de estímulos relacionados à alimentação e saciedade, crescimento, desenvolvimento e metabolismo intermediário, incluindo ações glicoregulatórias no cérebro (CARUSO e SHERIDAN, 2011).

A INS pertence à família de peptídeos que incluem também o IGF-1 e IGF-2 (Fatores de crescimento semelhantes à insulina), ILPs (Peptídeos semelhantes à insulina) e relaxinas (CHAN e STEINER, 2000; WILKINSON et al., 2005). Para estes autores, estes peptídeos são altamente homólogos entre os peixes. A habilidade da INS em regular aspectos anabólicos do metabolismo intermediário é bem conhecida, assim como, sua deficiência representa desordem patológica importante como o diabetes mellitus.

O pâncreas é descrito como a fonte principal de INS em vertebrados, entretanto, evidências sugerem que outros tecidos extrapancreáticos também produzem INS (CARUSO e SHERIDAN, 2011). Thorndyke et al. (1989) e Plisetskaya e Mommsen (1996) detectaram por radioimunoensaio elevadas concentrações de INS no cérebro de salmão (*Salmo salar*) e Mixina (*Myxine glutinosa*). A INS foi também determinada no cerebelo, hipotálamo, tálamo e no córtex de tilápias (HRYTSENKO et al., 2007) e RNAm de INS foi detectado no tecido adiposo mesentérico de carpas (ROY et al., 2003) e trutas arco-íris (CARUSO et al., 2008).

Por outro lado, níveis de INS foram substancialmente maiores em veias do sistema porta hepático quando comparados ao sangue da circulação sistêmica e a secreção deste hormônio em peixes é influenciada por fatores nutricionais, hormonais, neurais e ambientais (PLISETSKAYA et al., 1989; MOMMSEN e PLISETSKAYA, 1991).

A estimulação nervosa sobre a secreção pancreática da insulina por meio da administração da metacolina no peixe diabo negro (*Melanocentus johnsonii*) ocorreu pela interação com receptores muscarínicos (MILGRAM et al., 1991). De outro modo, a atividade adrenérgica de catecolaminas exógenas em baixas doses inibiu a liberação de INS no pâncreas de trutas (TAYLOR et al., 2003) e de enguias (INCE e THROPE, 1997). Hormônios como o glucagon, paratormônio, GH (crescimento) e os corticosteróides podem inibir a liberação da insulina reduzindo seus efeitos (TONSHOFF et al., 2005; SIT et al., 2005). Os elevados níveis de glicocorticóides em teleósteos foram associados com a redução sérica de peptídeos desta família, as IGFs, em uma variedade de circunstâncias estressantes como manejo de captura, confinamento, alterações osmóticas, entre outros em espécies como o salmão (*Thunnus maccoyii*), “silver perch” (*Bidyanus bidyanus*) e “southern black bream” (*Acanthopagrus butcheri*) (DYER et al., 2004). A administração na cavidade celomática de cortisol suprimiu a concentração sérica de IGF-1 e a expressão hepática de RNAm para IGF-1 em tilápias (KAJIMURA et al., 2003).

Inúmeros trabalhos realizados em mamíferos têm demonstrado o efeito vasodilatador da insulina, aumentando o fluxo sanguíneo arterial, venoso e na microcirculação (STEINBERG et al., 1994; GROVER et al., 1995). O efeito vasodilatador atribuído a este peptídeo foi associado à rápida liberação de óxido nítrico (NO) que, entre outros, atua inibindo a atividade de agregação plaquetária (TROVATI et al., 1997) e reduzindo a adesão de leucócitos no endotélio vascular, sugerindo a hipótese de atividade anti-inflamatória da INS (DANDONA et al., 2000). Porém, pouco se conhece sobre a participação da INS sobre a resposta inflamatória de peixes teleósteos.

Em mamíferos, com a ação dos mediadores químicos da inflamação como histamina, serotonina e bradiginina há uma abertura nas junções endoteliais ocorrendo a formação de fenestrações facilitadora de extravasamento de grandes partículas para o interstício. Em animais diabéticos raramente são observadas estas

fenestrações, no entanto com administração da insulina exógena há correção desta condição permitindo o extravasamento de partículas como carvão coloidal (GARCIA LEME et al, 1973). As células endoteliais atuam como estruturas alvo para ação da insulina, promovendo aumento da permeabilidade vascular na fase inicial da inflamação como observado por Moraes (1982), que por indução de inflamação por carreginina em pé de rato observou maior taxa de extravasamento de exsudato na fase inicial da indução inflamatória em animais tratados com insulina.

3.3 Alozano em peixes teleósteos

O alozano é um análogo tóxico da glucose que destrói seletivamente células produtoras de insulina no pâncreas após administração em roedores e outras espécies animais, causando diabetes mellitus insulina-dependente, chamada diabetes por alozano, com características similares ao diabetes tipo 1 de seres humanos (TYRBERG et al., 2001).

O alozano é seletivamente tóxico às células betas pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, por se acumularem no transportador de glicose denominado GLUT-2 (XU et al., 2004). Na presença de tióis intracelulares, o alozano gera radicais livres (ROS) em uma reação cíclica com sua redução a ácido dialúrico. A ação tóxica do alozano na célula beta inicia-se com a formação de radicais no ciclo de redox com a produção de radicais de O_2 que são convertidos em radicais altamente reativos e citotóxicos via reação de Fenton (LENZEN, 2008). Estes radicais resultam em necrose e apoptose das células beta (SZKUDELSKI, 2001).

Ince e Thrope (1975) constataram efeito diabetogênico do alozano nas doses de 50 e 100 $mg\cdot kg^{-1}$ em lúcio (*Esox lucius*), causando hiperglicemia nas primeiras 24 horas após administração via endovenosa. Em estudo de dose-resposta do alozano em tilápias, Xu et al. (2004) verificaram que doses de 150 e 300 $mg\cdot kg^{-1}$ de peso vivo, administrada via endovenosa, resultaram em necrose e diabetes nos peixes, porém segundo estes autores, doses menores de 75 $mg\cdot kg^{-1}$ empregadas em roedores não induziram o diabetes em tilápias, demonstrando uma maior resistência dos peixes ao alozano. Khanna e Rekhari (1972) observaram a

formação de focos necróticos em tecidos pancreáticos de “fóssil cat” (*Heteropneustes fossilis*) somente com elevadas doses de aloxano 400 e 600 mg·kg⁻¹, mas para tais achados refere-se ao fato destes autores terem utilizado a via intramuscular para administração do aloxano, o que poderia resultar em perdas no processo de absorção do aloxano.

3.4 Anti-inflamatório esteroide em peixes teleósteos

A dexametasona faz parte do grupo das drogas esteroideais, tipo glicocorticóide com potente ação anti-inflamatória, acreditando-se que seu modo de ação esteja relacionado à inibição da fosfolipase A2, responsável pela conversão enzimática de fosfolípidos de membrana em ácido aracônico (BOOTH e McDONALD, 2003), impedindo assim a formação de eicoisanoídeos.

Por outro lado, o cortisol apresenta amplo espectro de atividade em peixes teleósteos, combinando funções mineralocorticóides, comparáveis à apresentada pela aldosterona em vertebrados terrestres, e glicocorticóide. Neste contexto, este corticosteróide participa na regulação do equilíbrio hidromineral, no metabolismo energético, além de suprimir o sistema imune e a capacidade reprodutiva dos animais (WENDELAAR BONGA, 1997).

Em geral, os teleósteos submetidos ao estresse agudo ou crônico apresentam rápido aumento da concentração plasmática de cortisol, seguido de redução no número de linfócitos circulantes. Tal fato está frequentemente associado com a diminuição da resistência a patógenos oportunistas (WENDELAAR BONGA, 1997).

As elevadas concentrações de cortisol plasmático estavam associadas ao aumento de susceptibilidade às infecções, resultante da redução do número circulante de leucócitos e da produção de anticorpos, além da diminuição da atividade fagocítica de leucócitos (MONTERO et al., 1999). Após a administração exógena de cortisol, ocorreu aumento relativo do número circulante de neutrófilos, no entanto, verificou-se inibição da migração destas células para as lesões inflamatórias (BARTON e IWAMA, 1991; BELO et al., 2011). A migração, atividade fagocítica e capacidade respiratória de macrófagos foram diminuídas em peixes com

elevados níveis de cortisol circulante (MONTERO et al., 1999; ORTUÑO et al., 2001). Belo et al. (2005) verificaram efeito depressor sobre o recrutamento e acúmulo de macrófagos e na formação de gigantócitos em resposta inflamatória induzida por corpo estranho em pacu mantido em alta densidade de estocagem.

Em tilápias do Nilo tratadas com dexametasona, vacinadas e desafiadas com *Aeromonas hydrophila* observou-se diminuição da contagem celular no exsudato após 6 horas de evolução da resposta inflamatória, sendo este efeito supressor observado principalmente no número de granulócitos, caracterizando a ação anti-inflamatória do glicocorticóide na fase aguda da formação dos eicosanóides e liberação de enzimas pro-inflamatórias, diminuindo a permeabilidade vascular e migração de leucócitos para o foco lesado (MORAES et al., 2013, CLAUDIANO et al., 2013).

3.5 *Aeromonas hydrophila*

A *Aeromonas hydrophila* é um bacilo gram-negativo aeróbico que possui flagelo móvel, apresentando crescimento em meios simples. As colônias crescem de 1 a 3 mm de diâmetro a 25°C, durante 48 horas, sendo arredondadas, brilhantes e de coloração creme (ALEXANDRINO et al., 2000).

Consideradas oportunistas, se manifestam em hospedeiros debilitados ou infectados por outros patógenos (DOOLEY e TRUST,1988; MERINO et al.,1995). Neste caso, o estresse, principalmente provocado por condições ambientais e fisiológicas adversas, é considerado um fator predisponente ao aparecimento da doença causada por esta bactéria (MERINO et al.,1995).

Os fatores de risco predisponentes incluem alterações bruscas de temperatura, elevadas densidades de estocagem, poluição orgânica, hipóxia, entre outros. A bactéria *Aeromonas hydrophila* geralmente invade lesões de descontinuidades na pele do peixe provenientes de infecções por fungos ou ectoparasitas (NOGA,1986). Fatores produzidos pela bactéria, que podem facilitar o contágio, são importantes elementos de virulência bacteriana. Dentre estes se destacam as fimbrias, que facilitam sua adesão às células do hospedeiro (CIPRIANO, 2001).

Os sinais clínicos característicos da aeromonose em peixes são a septicemia hemorrágica, petéquias distribuídas por toda a superfície corporal do animal, anemia, corrosão de nadadeira, ulcerações oculares, escamas protusas, exoftalmia e distensão abdominal por ascite (AUSTIN e AUSTIN,1999; KIROV et al.,2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a aeromonose é considerada uma doença de veiculação hídrica para os seres humanos, apresentando grande importância para a saúde pública (MERINO et al., 1995). Em seres humanos, esta bactéria pode causar febre, dor abdominal, vômito, diarreia, meningite, endocardite, septicemia e inflamação do tecido conjuntivo, além de infecções respiratórias e intestinais, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (JANDA e ABBOTT, 1998).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e acondicionamento

Foram utilizadas 189 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem "GIFT", com peso médio 532 g (\pm 74 g), masculinizadas, oriundas da mesma desova, acondicionadas em 27 caixas d'água, com capacidade de 2500 L de água cada, abastecidas com água corrente desprovida de cloro, com vazão de 10 L/min por caixa d'água, proveniente de nascente, pertencentes a piscicultura "PIRAJUBA" localizada em Porto Ferreira – SP (Figura 1).



Figura1- Caixas d'água para acondicionamento dos peixes.

Após o transporte para as caixas d'água, os peixes foram aclimatados durante 30 dias para a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade retornassem aos níveis normais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g-L⁻¹ (CARNEIRO e URBINATI, 2001).

Os peixes receberam ração comercial peletizada (28% de proteína bruta), LAGUNA-Socil®. O arraçoamento dos animais foi feito duas vezes ao dia, alimentados pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa dos tanques.

Na análise da qualidade da água foi avaliada a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido pelo aparelho YSI, modelo 55, e o potencial hidrogeniônico e a condutividade elétrica pelo aparelho YSI, modelo 63. Os resultados obtidos sobre os parâmetros físico e químico da água estão expressos na Tabela 1. Contudo,

demonstraram condições ambientais satisfatórias para a criação de tilápias, durante o período experimental de acordo com (SIPÚBA – TAVARES, 1995; BOYD, 1990).

Tabela 1- Valores médios e os respectivos desvios-padrão observados para a avaliação do pH, condutividade elétrica, temperatura e oxigênio dissolvido na água dos tanques durante o período experimental.

Parâmetros	Grupos	Período								Média	Des. Padrão
		0HPI (6 horas)		12HPI (18 horas)		24HPI (6 horas)		48HPI (6 horas)			
		Média	D. P	Média	D. P	Média	D. P	Média	D. P		
Potencial hidrogeniônico (pH)		6,6	± 0,07	6,5	± 0,07	6,5	± 0,07	6,4	± 0,00	6,5	± 0,21
Condutividade elétrica (µS/cm)		89,6	± 0,57	94,6	± 0,78	89,8	± 2,12	89,1	± 1,34	90,8	± 4,81
Temperatura (C°)		26,5	± 0,07	28,8	± 0,21	26,0	± 0,71	25,8	± 0,35	26,7	± 1,34
Oxigênio dissolvido (mg/L)		5,1	± 0,21	6,4	± 0,14	5,4	± 0,99	4,9	± 0,07	5,4	± 1,41

* Horas após inoculação (HPI)

4.2 Delineamento experimental

Os peixes foram distribuídos em nove grupos de acordo com a Tabela 2. Foram avaliados sete animais por grupo em três períodos, a saber: 6, 24 e 48 horas após a administração do inóculo de *A. hydrophila* na bexiga natatória.

Tabela 2 – Distribuição de animais nos diferentes tratamentos para estudo da inflamação aguda.

Grupos	Tratamentos	Horas após inóculo (HPI) ¹		
		6	24	48
C. N²	Não inoculado + não tratado (controle negativo)	N= 7	N= 7	N= 7
C. P	Inoculado + não tratado (controle positivo)	N= 7	N= 7	N= 7
I	Inoculado + insulina	N= 7	N= 7	N= 7
D	Inoculado + dexametasona	N= 7	N= 7	N= 7
I + D	Inoculado + insulina + dexametasona	N= 7	N= 7	N= 7
A	Inoculado + aloxano	N= 7	N= 7	N= 7
A + I	Inoculado + aloxano + insulina	N= 7	N= 7	N= 7
A + D	Inoculado + aloxano + dexametasona	N= 7	N= 7	N= 7
A + D + I	Inoculado + aloxano + dexametasona + insulina	N= 7	N= 7	N= 7

¹ Estímulo inflamatório na bexiga natatória por *A. hydrophila*.

² Inoculado com solução salina a 0,65%.

4.3 Anestesia dos peixes

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 v:v (para tratamento e estímulo inflamatório.) e 1:500 v:v (para eutanásia). Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1 litro de água (WEDEMEYER, 1970). Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados nos aquários com fluxo de água contínuo.

4.4 Metodologia empregada no isolamento de *Aeromonas hydrophila*

A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada neste trabalho foi isolada de peixes infectados naturalmente, apresentando lesões características de aeromonose (POPOFF, 1984). Fornecidas pelo NEPEAM (Núcleo de Estudo e Pesquisas Ambientais em Matologia – FCAV- UNESP/Campus de Jaboticabal).

4.4.1 Isolamento das colônias do gênero *Aeromonas*

Após coleta, com “swab” estéril, das lesões características de aeromonose, foi inserido em tubo estéril contendo meio de caldo tripticase-soja-TSB (Tryptic Soy Broth – Biolife), adicionado de ampicilina para enriquecimento seletivo e permanecendo incubado por 24 horas a 28 °C para multiplicação bacteriana.

A partir das culturas de enriquecimento seletivo foram semeadas, com auxílio de alça de níquel-cromo, placas contendo ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina (BUCHANAN e PALUMBO, 1985; MAJEED et al., 1990) e ágar dextrina-ampicilina, segundo Havelaar e Vonk (1988). Nos dois casos a ampicilina foi adicionada após a esterilização, na concentração de 10 mg/L. A incubação foi realizada em incubadora para demanda bioquímica de oxigênio, a 28 °C por 24 horas.

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram colhidas, para cada um dos meios utilizados, até cinco colônias com características sugestivas do gênero *Aeromonas*, que são: Ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina: colônias amareladas, com halo transparente devido à hidrólise do amido; Ágar

dextrina-ampicilina: colônias amareladas, circundadas por halo decorrente da hidrólise da dextrina.

As colônias com as características acima descritas foram semeadas em tubos com ágar tripticase-soja (TSA) inclinado e incubadas a 28 °C, por 24 horas. Após o período de incubação foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas que se apresentaram na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas e Gram negativas, foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (SAAD et al., 1995). Após incubação a 28 °C por 24 horas, as culturas que apresentaram reação ácida, tanto na base como no bisel, com ou sem formação de gás, foram novamente repicadas em ágar tripticase-soja e, em seguida, submetidas às provas da motilidade, oxidase, catalase e resistência ao agente vibriostático O/129 (fosfato de 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine), seguindo esquema de caracterização adotado por Popoff (1984).

Os cultivos que apresentaram as características de motilidade, resistência ao agente vibriostático e oxidase e catalase positivas, foram considerados como de *Aeromonas* sp.

4.4.2 Identificação da espécie *Aeromonas hydrophila*

Para confirmação da espécie, foi feita extração e quantificação do DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene 16S rDNA e sequenciamento deste produto de PCR. A metodologia utilizada foi a recomendada pelo do kit Axyprep® miniprep para DNA genômico bacteriano (AXIGEN).

A quantificação das amostras extraídas ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e a contaminação por proteínas foi mensurada espectrofotometricamente através do aparelho NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific).

Para a confirmação da cobertura e fidelidade dos primers utilizados, as amostras de DNA genômico foram amplificadas pela PCR. A reação consistiu de: 2,5 μL de tampão 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl); 0,2 μL de 25 mM dntp; 1,0 μL 50 mM MgSO_4 ; 0,2 μL de Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen); 2,0 μL de cada primer; DNA template 25 ng; água ultra-pura q.s.p. 25 μL de reação. A reação de PCR utilizada foi: 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C

específica para anelamento de cada primer por 30 segundos, 68 °C por 1 minuto e meio e 68 °C por 10 minutos para extensão final.

A reação de PCR foi realizada utilizando a seguinte sequência de termociclos: 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 50 °C específica para anelamento de cada primer por 40 segundos, 72 °C por 1 minuto e meio e 72 °C por 7 minutos para extensão final. Os primers usados foram rD1e fD1(16S rDNA degenerado).

Os amplicons gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, diluído em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0). Foram aplicados a cada poço do gel, 5 µL de produto de PCR, 1 µL de tampão de corrida (10 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 0,03% bromophenol blue, 0,03% xylene cyanol, 60% glicerol) e 0,5 µL de GelRed™ (Biotium) 20X. A corrida foi realizada seguindo as recomendações de Sambrook et al., (2001).

Os produtos de PCR foram purificados pelo Kit MinElute (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante.

Em seguida, fez-se a quantificação dos produtos de PCR purificados em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific).

Os produtos de PCR das amostras foram amplificados com a enzima AmpliTaq polimerase e “BigDye Terminator” (Applied Biosystems) conforme as recomendações do fabricante, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores (rD1 e fD1). O sequenciamento foi realizado em aparelho ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram visualizadas e manipuladas no programa Sequencer 5.0 (Gene Codes Corporation), no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (Crebio - UNESP Jaboticabal, SP) Primeiramente, as porções iniciais e finais das sequências foram trimadas, mantendo apenas a porção de alta qualidade. Após limpeza das sequências, foi realizado alinhamento das fitas “forward” e “reverse” de cada conjunto de “primers”, respeitando um mínimo de 85% de correspondência entre as sequências e sobreposição mínima de 20%. A posição do alinhamento foi guardada e as sequências visualizadas no programa Chromas 1.45 (Griffith University, Australia).

A localização exata dos primers foi encontrada, uma sequência no formato fasta exportada e o inserto do produto de PCR selecionado. Utilizando a ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), o fragmento foi comparado com as sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), admitindo-se concordância de no mínimo 95% para confirmação da especificidade da sequência (Figura 2). Contudo, os resultados observados no estudo genético da cepa bacteriana utilizada no experimento, confirmam a homologia com *Aeromonas hydrophila*, subespécie *dhakensis*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas punctata strain ATCC 15468 16S ribosomal RNA, partial sequence	1508	1508	94%	0.0	99%	NR_029252.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila subsp. dhakensis strain : LMG 19562 16S ribosomal RNA, complete sequence	1507	1507	94%	0.0	99%	NR_042155.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas enteropneustes strain DSM 6384 16S ribosomal RNA, complete sequence	1471	1471	94%	0.0	99%	NR_044848.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas salmonicida subsp. piscimorbia strain 34-mel 16S ribosomal RNA, partial sequence	1427	1427	94%	0.0	98%	NR_025091.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas molluscorum strain 845 16S ribosomal RNA, partial sequence	1427	1427	94%	0.0	98%	NR_025807.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas salmonicida strain JCM7873 16S ribosomal RNA, complete sequence	1427	1427	94%	0.0	98%	NR_040829.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas popoffii strain LMG 317541 16S ribosomal RNA, partial sequence	1427	1427	94%	0.0	98%	NR_025317.1
<input type="checkbox"/> Aeromonas hydrophila strain 858F 16S ribosomal RNA, partial sequence	1424	1424	94%	0.0	97%	NR_043085.1

Figura 2 - Comparação genética da cepa do gênero *Aeromonas* no GenBank.

4.5 Preparação do inóculo bacteriano

Após a obtenção de colônias puras, estas foram semeadas em meio líquido TSB. Após 24 horas de incubação a 28 °C, o material foi centrifugado a 3.000 rpm/5 minutos, em centrífuga clínica, desprezando-se o sobrenadante e a massa bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) precipitada foi diluída em solução salina estéril (NaCl 0,65%), até a obtenção da concentração $7,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, utilizando-se contagem em placa, modificado de (BOZZO et al., 2007).

4.6 Indução do processo inflamatório

Para verificação da eficácia de indução do processo inflamatório na bexiga natatória, foi realizado um pré-ensaio inoculando 1 mL do inóculo de *Aeromonas hydrophila*. Em 48 horas após o inóculo coletou-se o conteúdo formado na bexiga natatória para análise em microscopia, confirmando-se a dose de 1 mL como efetiva para indução de aerocistite sem comprometimento vital pelo período de 48 horas. Período este necessário para estudo proposto.

Neste sentido, foi injetado 1 mL do inóculo de *Aeromonas hydrophila* à esquerda do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa estéreis de 1 mL, para atingir a bexiga natatória anterior (Figura 3). Após o manuseio experimental, indução do processo inflamatório, os animais foram novamente colocados em aquário com fluxo de água contínuo e banhados em solução de cloreto de sódio, como anteriormente descrito.



Figura 3 - Inoculação de *Aeromonas hydrophila* na região dorso lateral esquerdo, ao final do opérculo.

4.7 Administração do Aloxano

O uso do aloxano (Sigma®) foi por via endovenosa aplicado em vaso caudal (Figura 4), na dose de 100 mg-Kg^{-1} de peso vivo utilizando como solvente solução salina estéril (NaCl 0,65%). A administração de aloxano foi feita duas semanas antes da realização da indução da reação inflamatória. Animais não pertencentes aos grupos tratados com aloxano foram injetados pela mesma via em igual volume solução salina estéril (NaCl 0,65%). Após o manuseio experimental, os animais

foram novamente colocados em aquário com fluxo de água contínuo e banhados em solução de cloreto de sódio.



Figura 4 – Aplicação de aloxano via endovenosa em vaso caudal.

4.8 Administração de dexametasona e insulina

A aplicação dos diferentes compostos foi realizada imediatamente após a inoculação de *A. hydrophila* nos grupos correspondentes, com administração de dexametasona (Cortvet[®]), via intramuscular na região dorso-lateral esquerdo (Figura 5), na dose única de 2 mg·kg⁻¹ conforme Belo et al. (2011) e administração de insulina (Lantus[®]) via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda (Figura 6), na dose única de 10 UI·kg⁻¹ de peso vivo de acordo com padronização em ensaio piloto. Após o manuseio experimental, indução do processo inflamatório, os animais foram novamente colocados em aquário com fluxo de água contínuo e banhados em solução de cloreto de sódio.



Figura 5 – Administração de dexametasona via intramuscular na região dorso lateral esquerda.



Figura 6 - Administração de insulina via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda.

4.9 Obtenção e avaliação do exsudato da bexiga natatória

Para a avaliação do acúmulo de células totais, nos tempos pré-estabelecidos de 6, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório, os animais foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento do plano anestésico com benzocaína como descrito anteriormente. A seguir, injetado 1 mL de solução tampão fosfato (gelada) à 0,1 molar com pH 7,2 (PBS), contendo EDTA a 0,09%, à esquerda do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa esteril de 1mL, para atingir a bexiga natatória anterior. Após aplicação do PBS, movimentou-se cuidadosamente o peixe para suspender o conteúdo exsudativo. Em seguida, os peixes foram dissecados por um corte longitudinal ventral, do ânus ao opérculo; outro corte longitudinal ventro-latero-dorsal, do ânus até a cabeça acima da linha lateral. Esta dissecação permite ampla visão de todos os órgãos, permitindo visualização da bexiga natatória (Figura 7).

Logo após dissecação, com auxílio de instrumentos cirúrgicos, o volume total do exsudato foi recolhido com pipeta de Pasteur esteril e descartável, o volume recolhido foi transferido para tubo falcon e mantidos posteriormente sob-refrigeração. A solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada a 1000 rpm por cinco minutos em centrífuga clínica. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento total ressuscitado com a adição de volume conhecido (PBS) e uma alíquota desse volume transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em

microscopia de luz (Figura 8). Em seguida, multiplicou-se o valor de células encontrado na câmara de Neubauer pelo fator de diluição.

Para a contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos foi colocada uma alíquota do sedimento total ressuspendido sobre lâmina histológica para extensão da mesma. Esta lâmina foi recoberta previamente com um filme de soro de tilápias. Após extensão do exsudato, a lâmina foi deixada secar em temperatura ambiente com posterior fixação em álcool metílico, por um minuto. Depois de secas, foram coradas com corante “May-Grunwald-Giemsa-Wright” (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz de até 200 células dentre os diferentes tipos de células acumuladas no foco inflamatório (Figura 9).



Figura 7 - Exposição da bexiga natatória.

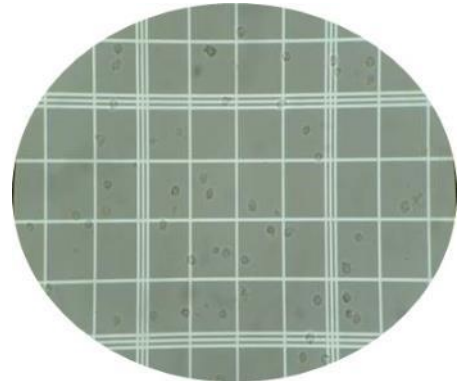


Figura 8 - Avaliação do acúmulo de células totais em câmara de Neubauer.

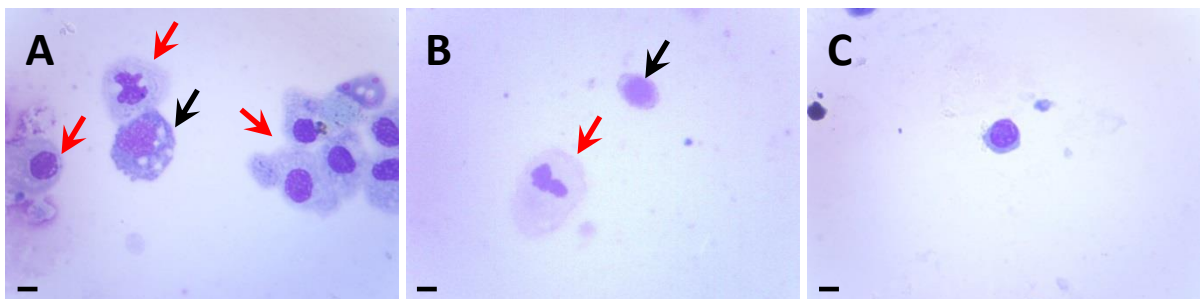


Figura 9 - Contagem dos diferentes tipos celulares em exsudato obtidos da aerocistite induzido em tilápias. Extensão do exsudato, macrófago (A, seta preta), neutrófilos (A,B, setas vermelhas), trombócitos (B, seta preta) e linfócito (C). Células foram coradas com corante “May-Grunwald-Giemsa-Wright”. Barra= 5µm.

4.10 Avaliação do hemograma

Para avaliação do hemograma foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal (Figura 10), com auxílio de seringas descartáveis previamente heparinizadas, às 6, 24 e 48 horas após estímulo bacteriano. A partir das amostras de sangue total foi feita a contagem direta de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer (Figura 11), utilizando-se a solução de Natt e Herrick (1952) como diluente na proporção de 1:100 v:v. Os eritrócitos foram quantificados nos cinco quadrantes secundários em diagonal do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 5000 mil. Em relação à determinação total de leucócitos e trombócitos foram quantificados todos juntos nos 25 quadrantes secundários do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 1000.

Para determinação da proporção de trombócitos e leucócitos no sangue foram realizadas extensões sanguíneas em lâmina. Depois de secas, foram coradas com corante “May-Grunwald-Giemsa-Wright” segundo Tavares-dias e Moraes (2003). Assim, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse (Figura 12).



Figura 10 - Punção de vaso caudal.

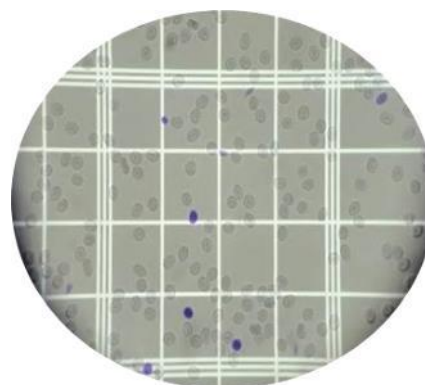


Figura 11 - Contagem direta de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer.

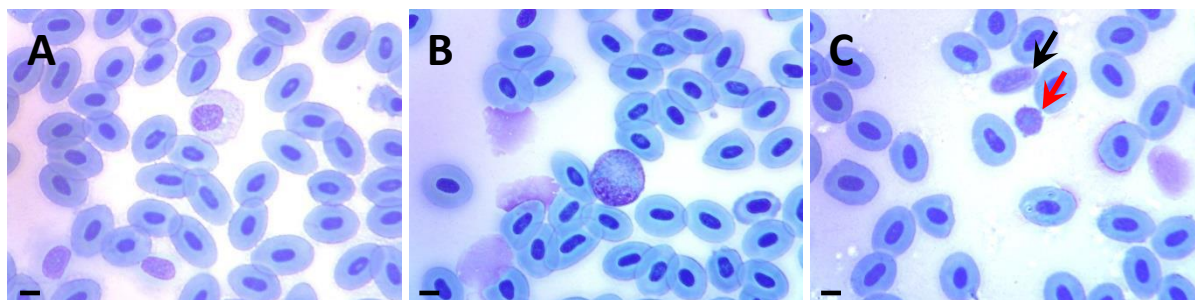


Figura 12 - Contagem de trombócitos e diferencial leucocitário no sangue de tilápias. Neutrófilo próximo ao centro (A). Monócito próximo ao centro (B). Seta preta mostra trombócito e seta vermelha mostra linfócito (C). Células foram coradas com corante “May-Grunwald-Giemsa-Wright”. Barra= 5μm.

4.11 Avaliação do bioquímico sérico

A glicemia dos animais foi determinada utilizando o aparelho Accu-Chek Performa, e alíquotas de soro foram destinadas a avaliação da atividade hepática de fosfatase alcalina, glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais e albumina através da determinação enzimática e colorimétrica em analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest – Bioplus®).

4.12 Avaliação morfométrica e histopatológica dos órgãos

Após a necropsia alguns órgãos foram coletados para histopatologia (Figura 13). O tecido hepático, renal (porção cranial e caudal) e esplênico foi coletado para avaliação morfométrica conforme Weibel et al. (1969), por meio da proporção entre peso do órgão (PO) e peso corporal (PC) expressos como índice somático hepático, renal e esplênico, calculado pela fórmula: Índice somático (IS) = $PO \times 100/PC$.

Imediatamente após a coleta, um fragmento de cada órgão foi fixado em paraformaldeído a 4 % preparado em solução tampão fosfato, a uma concentração molar de 0,1M e pH 7,2. Após 24 horas, o mesmo foi transferido para o álcool a 70%. Após os procedimentos de fixação, desidratação, diafanização e inclusão dos tecidos em parafina, foram feitos corte em espessura de 5 μm e as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE).

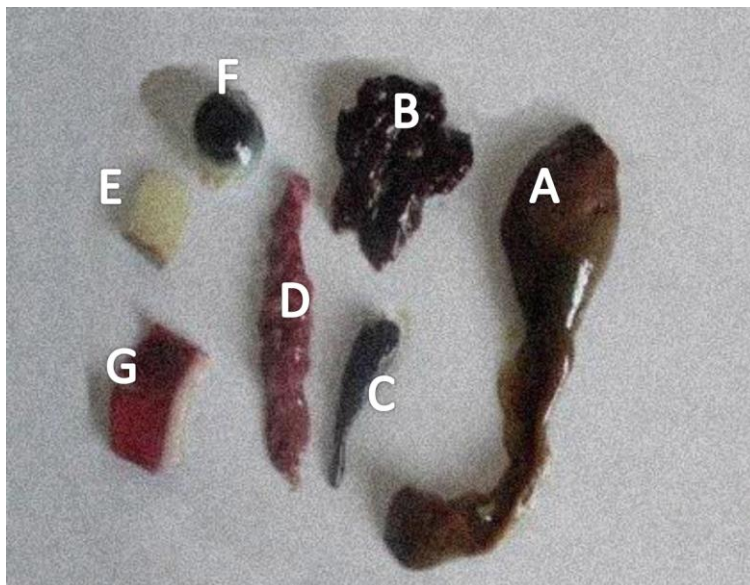


Figura 13 – Órgãos coletados: fígado (A); rim, porção cranial (B); baço (C); rim, porção caudal (D); músculo esquelético (E); globo ocular (F); brânquia (G).

4.13 Estatística utilizada para avaliação dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente por um delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial "split-plot-design" (com 9 tratamento x 3 tempos).

A comparação entre os diferentes tratamentos foi determinada usando procedimento GLM - General Linear Model (SAS, 2001). Diferença significativa ($P < 0,05$) foi estimada com base no Teste-T de acordo com (SNEDECOR e COCHRAN, 1974).

Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação entre os tratamentos dentro de cada tempo estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes tempos estudados.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do acúmulo celular na aerocistite

De um modo geral, em relação ao estímulo da reação inflamatória (aerocistite) induzida por *A. hydrophila*, (Figura 14), observou-se maior acúmulo de neutrófilos no exsudato em comparação com outros tipos celulares que participam na inflamação, com pico de acúmulo 24 horas após inóculo (HPI). No entanto, os peixes dos grupos (C.P) apresentaram maior acúmulo de neutrófilo no tempo de 48 HPI. Por outro lado, em comparação aos tratamentos, o grupo controle negativo (solução salina) apresentou menor acúmulo de neutrófilo 48 HPI em relação ao grupo (C.P).

O grupo (I) 6 HPI apresentou maior acúmulo de neutrófilos em comparação aos demais grupos, observou-se este efeito também 24 HPI em grupo com (I) e (I+D) no entanto, apresentou-se o mesmo menor acúmulo no tempo 48 HPI em relação a 24 HPI.

No grupo (D) e (A+D), observou-se 24 HPI maior acúmulo de neutrófilo comparado ao controle positivo, no entanto não havendo diferença entre os mesmos grupos no tempo 48 HPI.

Em tilápias aloxano-diabéticas 24 HPI apresentaram maior acúmulo de neutrófilos em relação aos peixes do grupo (C.P), independente das associações farmacológicas.

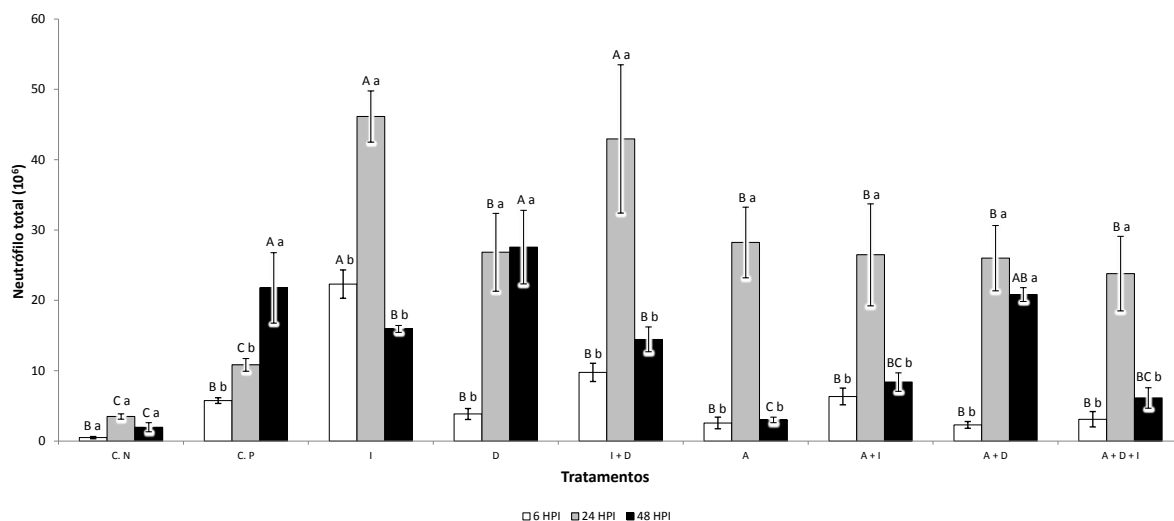


Figura 14 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de neutrófilo em exsudato proveniente do estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C.N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

Na avaliação de linfócitos presente na aerocistite, (Figura 15), observou-se tanto no grupo controle negativo e/ou positivo maior acúmulo ao longo do tempo. No entanto, comparando-os no tempo de 48 HPI observou-se menor acúmulo no grupo controle negativo. Em relação à análise dos diferentes grupos, observa-se maior acúmulo em grupo (I) às 6 HPI e grupo (D) 48 HPI. Entretanto, tilápias aloxano-diabéticas apresentaram menor acúmulo de linfócitos no exsudato 48 HPI em relação aos peixes que foram inoculados com *A. hydrophila*.

O acúmulo de trombócitos no foco inflamatório, em animais controle com aerocistite por *A. hydrophila* (C.P) apresentou-se maior em comparação às tilápias inoculadas com salina (C.N) nos diferentes tempos (Figura 16). Na comparação entre os grupos inoculados com *A. hydrophila*, observou-se 6 HPI menor acúmulo em grupos tendo associações de aloxano e dexametasona em seus tratamentos. No tempo de 24 HPI, peixes tratados com insulina (I) apresentaram maior acúmulo de trombócitos comparadas aos demais grupos, no entanto, não apresentando acúmulo 48 HPI. Da mesma forma, tilápias tratadas com aloxano não apresentaram acúmulo de trombócitos 48 HPI. Peixes dos grupos (C.P), (D) e (I+D), apresentam contagem de trombócitos ao longo de estudo.

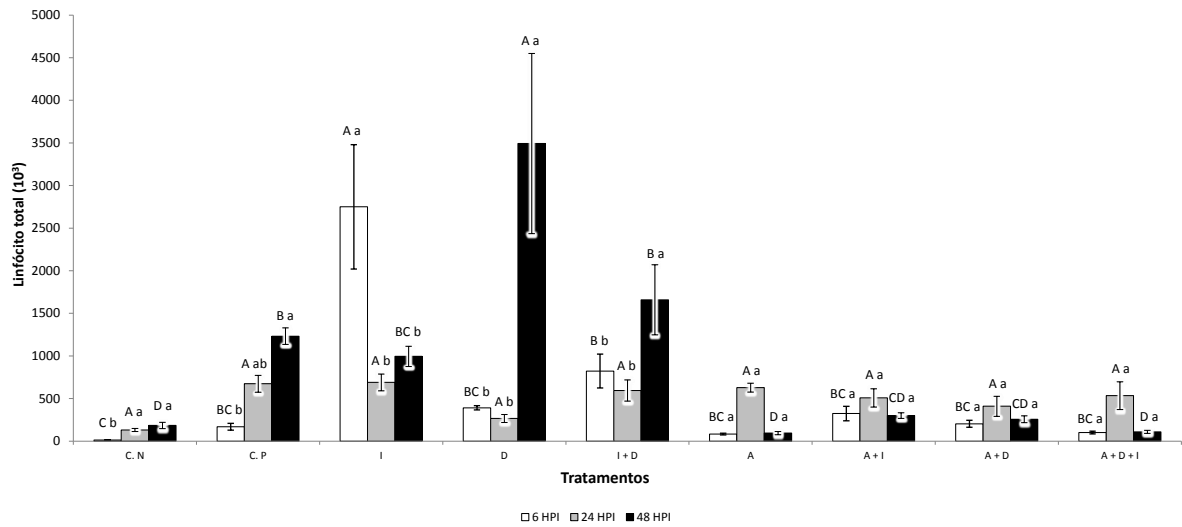


Figura 15 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de linfócitos em exsudato proveniente do estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C.N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

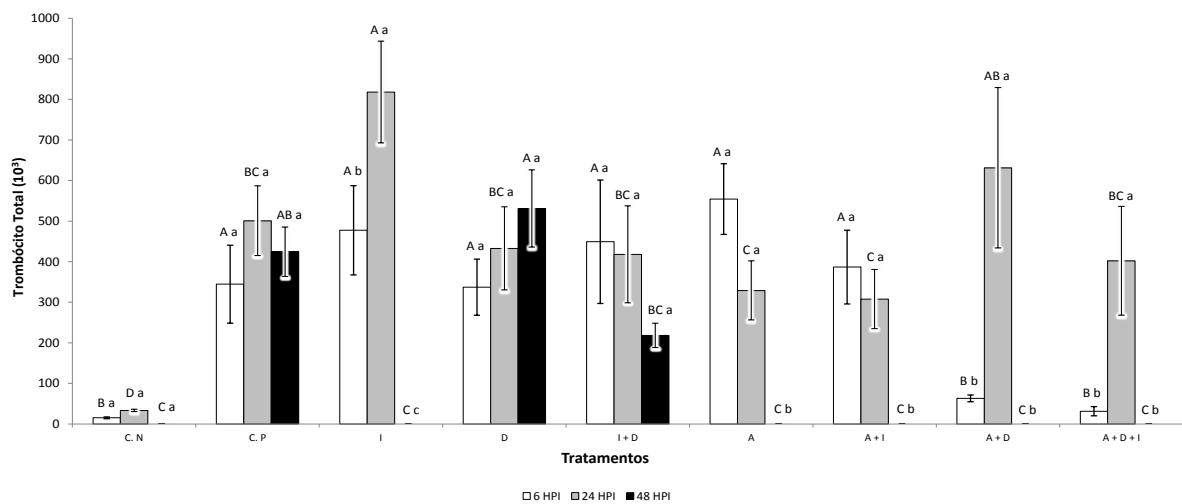


Figura 16 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de trombócitos em exsudato proveniente do estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C.N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

Analisando a evolução da reação inflamatória em relação a macrófagos, de um modo geral, o acúmulo ocorreu tardiamente no tempo de 48 HPI na maioria dos grupos, no entanto, não apresentando acúmulo em tilápias tratadas com dexametasona (D) nos diferentes tempos. Diferentemente, tilápias tratadas com insulina (I) apresentaram acúmulo de macrófagos desde 6 HPI, tendo maior acúmulo as 48 HPI em comparação aos demais grupos (Figura 17).

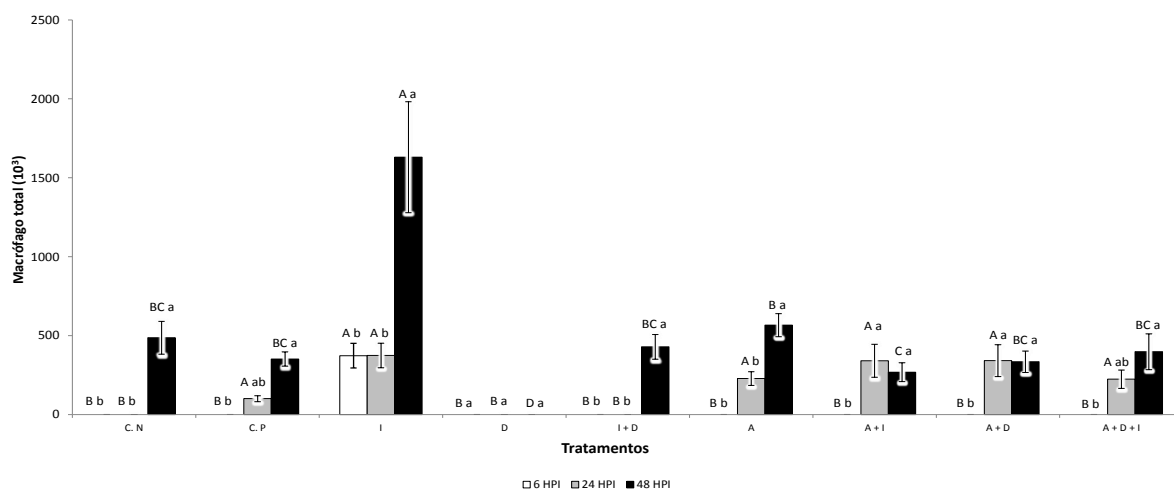


Figura 17 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de macrófagos em exsudato proveniente do estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C.N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

5.2 Avaliação do hemograma na aerocistite

5.2.1 Leucograma

No estudo do número de neutrófilo no sangue, observou-se neutrofilia em animais controle com aerocistite por *A. hydrophila* (C.P) quando comparado a tilápias inoculadas com salina (C.N) 6 HPI. Por sua vez, analisando grupos que receberam estímulo inflamatório, induzido por *A. hydrophila*, notou-se neutropenia em peixes dos grupos (I), (D) e (A) 6 HPI, sendo que peixes tratados com dexametasona (D) 48 HPI apresentaram neutrofilia quando comparado aos demais grupos. Observou-se também que peixes aloxano-diabéticos tratados com insulina,

apresentam neutrofilia 6 e 24 HPI, independente da associação com dexametasona (Figura 18).

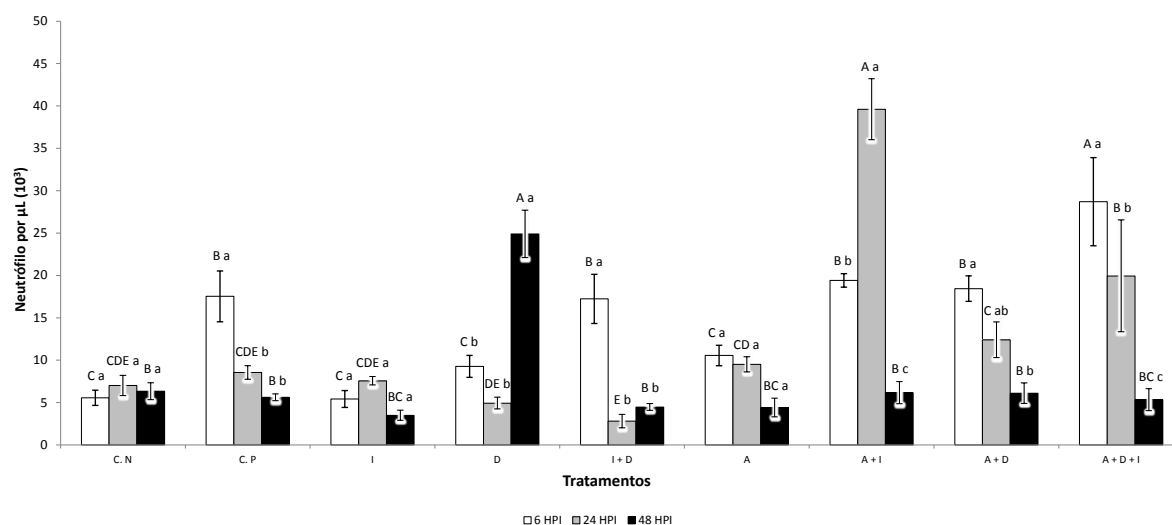


Figura 18 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de neutrófilo no sangue de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C.N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

Resultados observados na contagem de linfócitos no sangue, revelaram linfocitose em tilápias controle inoculadas com *A. hydrophila* (C.P) comparadas aos peixes do grupo inoculados solução salina (C.N) 6 HPI. No entanto, observou-se em 24 e 48 HPI a inversão desse quadro. Quando se compara as contagens de linfócitos entre os diferentes grupos inoculados com *A. hydrophila* observou-se que os peixes tratados com dexametasona e suas associações apresentaram linfocitopenia 6 e 24 HPI. Porém tilápias tratadas com associações (A+D) 48 HPI apresentaram linfocitose em comparação aos peixes controle inoculados com *A. hydrophila* (C.P) 48 HPI. Em peixes dos grupos (A) e (A+I), apresentaram linfocitose no tempo de 6 e 48 HPI em relação aos demais grupos (Figura 19).

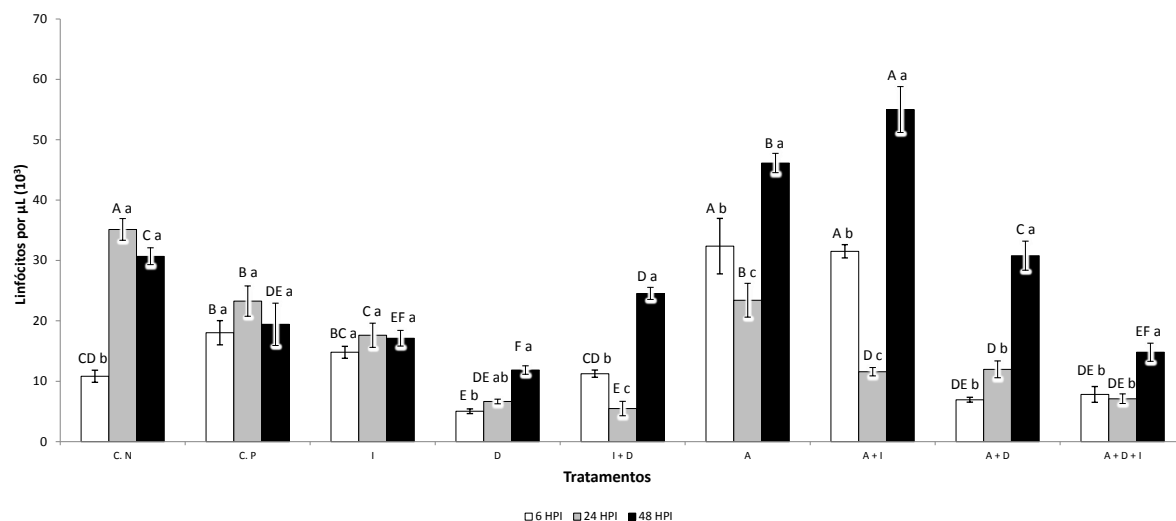


Figura 19 - Valores médios ($n=6$) e erro padrão médio da contagem de linfócitos no sangue de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C.N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. $Pr > F < .0001$.

O estudo de monócitos no sangue em tilápias induzida aerocistite (Figura 20) de um modo geral, não apresentaram diferença nos valores entre os 9 grupos 6 HPI. Mas quando comparamos os diferentes tipos de estímulo inflamatório no tempo, observou-se monocitose nas 24 e 48 HPI em grupo (C.P) em relação ao grupo (C.N). Sendo observado em grupo (C.P) expressiva monocitose nas 48 HPI. Resultados obtidos 24 HPI em grupos induzido aerocistite por *A. hydrophila*, notou-se monocitopenia nos grupos (D), (I+D), (A) e (A+D+I), observando o contrário em grupo (A+I). No entanto, avaliação 48 HPI, em relação aos peixes aloxano-diabéticos, observou-se monocitose.

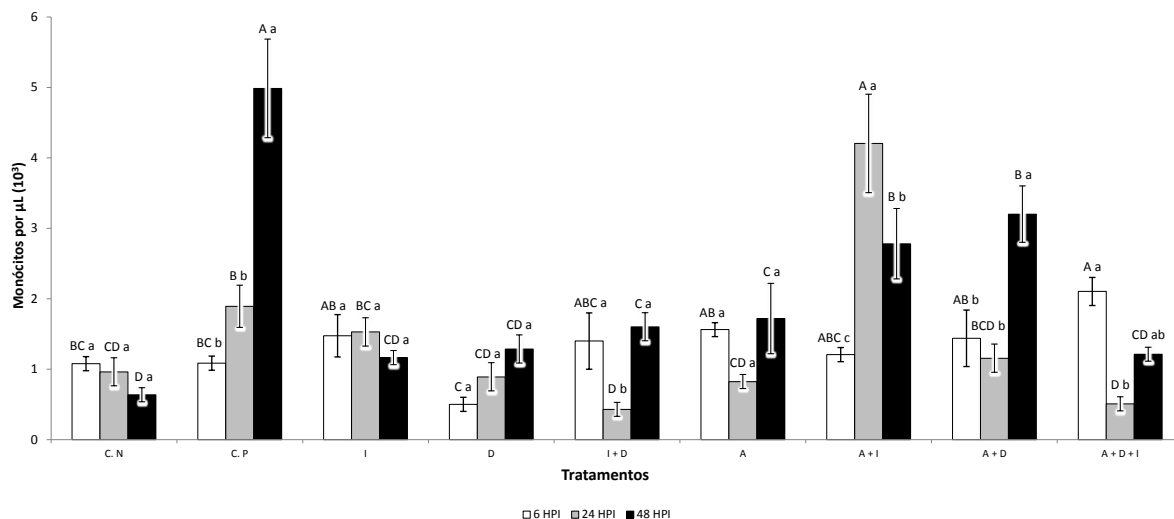


Figura 20 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de monócitos no sangue de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (**C. N**); controle positivo (**C.P**); insulina (**I**); dexametasona (**D**); insulina e dexametasona (**I+D**); aloxano (**A**); aloxano e insulina (**A+I**); aloxano e dexametasona (**A+D**); aloxano, dexametasona e insulina (**A+D+I**)}. $Pr > F < .0001$.

5.2.2 Trombograma

Em peixes dos grupos (C.N) e (C.P), os valores de trombócitos não diferiram 6 HPI, no entanto, na avaliação dos mesmos ao longo do tempo, o grupo (C.P) apresentou trombocitose 24 HPI e trombocitopenia 48 HPI (Figura 21). Na Comparação de peixes inoculados com *A. hydrophila*, observou-se trombocitose nos grupos, tendo em seu tratamento associações de aloxano juntamente com insulina no tempo de 6 HPI, em grupos (D), (I+D) e (A+I) apresentaram trombopenia 24 HPI e em grupos (I), (I+D), (A), (A+I) e (A+D) trombocitose 48 HPI.

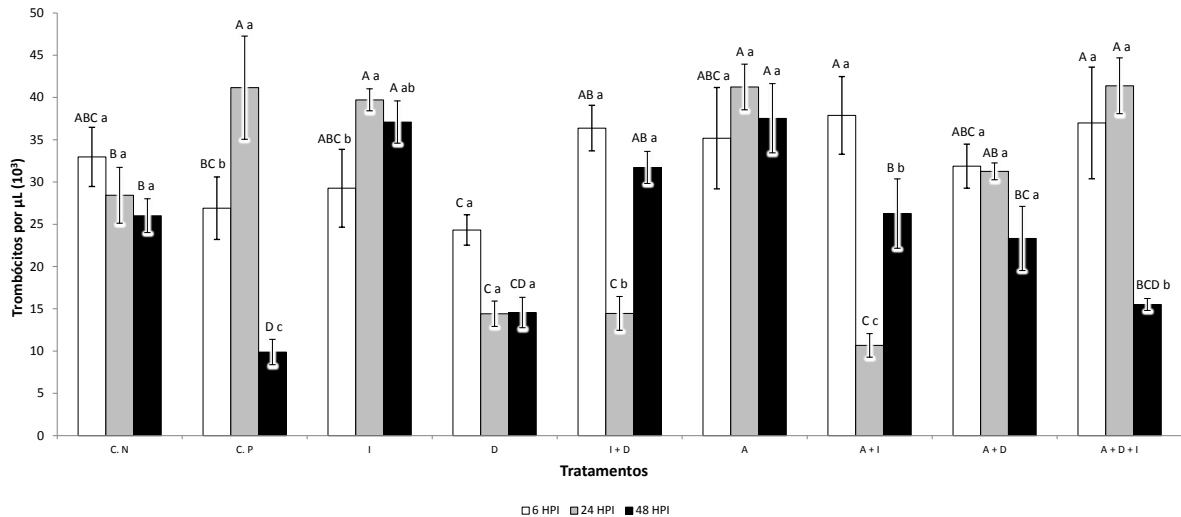


Figura 21 - Valores médios (n=6) e erro padrão médio da contagem de trombócitos no sangue de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória em diferentes tempos e tratamentos. {controle negativo, animais que receberam solução salina (C.N); controle positivo (C.P); insulina (I); dexametasona (D); insulina e dexametasona (I+D); aloxano (A); aloxano e insulina (A+I); aloxano e dexametasona (A+D); aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

5.2.3 Estudo eritrocitário

Resultados ao longo do tempo demonstraram que peixes injetados com solução salina na bexiga natatória (C.N) tiveram aumento de hemoglobina, diminuição de volume corpuscular média e aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média. Observou-se que os animais controles com salina (C.N) apresentaram maiores valores de eritrócitos circulantes 24 HPI. Entretanto, tilápias inoculadas com *A. hydrophila* (C.P) quando comparadas aos peixes do grupo com salina (C.N), observou-se em 6 HPI maiores valores de hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média. Por sua vez, tilápias com aerocistite por *A. hydrophila* avaliadas 48 HPI apresentaram maiores valores percentuais de hematócrito, volume corpuscular médio e menor concentração de hemoglobina corpuscular média em relação a tilápias injetado solução salina na bexiga natatória (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de eritrócitos, percentual de hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina (C.N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}.

GRUPOS*	Hematócrito (%)	Eritrócito ($\times 10^6/\mu$)	Hemoglobina (g/dL)	VCM	CHCM
6H	C. N. 34,4 \pm 1,1 A a	1,551 \pm 0,03 BC b	7,2 \pm 0,1 B b	221,3 \pm 5,3 A a	21,4 \pm 0,6 B b
	C. P. 31,0 \pm 1,1 A b	1,371 \pm 0,04 C b	8,3 \pm 0,3 A a	221,6 \pm 6,0 A a	24,9 \pm 1,0 A a
	I 34,4 \pm 0,9 A a	1,725 \pm 0,04 AB b	7,3 \pm 0,1 B ab	204,8 \pm 7,7 A a	21,6 \pm 0,3 B a
	D 35,3 \pm 1,0 A a	1,763 \pm 0,02 A a	7,0 \pm 0,1 BC b	229,3 \pm 10,6 A a	20,4 \pm 0,6 B b
	I + D 33,8 \pm 1,6 A a	1,929 \pm 0,03 A a	6,2 \pm 0,2 D c	170,3 \pm 9,8 B b	20,0 \pm 1,3 B a
	A 30,8 \pm 2,1 A b	1,475 \pm 0,11 C b	6,8 \pm 0,6 BCD c	211,7 \pm 10,2 A a	20,5 \pm 1,4 B a
	A + I 34,8 \pm 1,6 A b	1,727 \pm 0,05 AB c	6,8 \pm 0,3 BC b	212,7 \pm 15,0 A a	19,7 \pm 0,8 B b
	A + D 34,7 \pm 1,2 A b	1,849 \pm 0,04 A b	6,4 \pm 0,2 CD b	200,9 \pm 7,5 AB a	16,6 \pm 0,9 C b
	A + I + D 33,8 \pm 0,7 A a	1,739 \pm 0,08 AB a	6,6 \pm 0,3 BCD b	199,8 \pm 12,8 AB a	19,3 \pm 0,8 BC a
24H	C. N. 34,5 \pm 0,7 BC a	1,978 \pm 0,11 ABC a	8,1 \pm 0,3 CD ab	200,5 \pm 10,5 A ab	23,5 \pm 0,8 BC a
	C. P. 32,8 \pm 0,5 BC b	1,920 \pm 0,08 BC a	6,8 \pm 0,2 E b	174,1 \pm 3,8 AB b	21,9 \pm 0,9 BCD b
	I 31,5 \pm 0,7 C a	2,091 \pm 0,04 ABC a	6,9 \pm 0,2 E b	146,8 \pm 3,8 BC b	22,7 \pm 0,7 BCD a
	D 37,1 \pm 0,8 B a	1,925 \pm 0,08 C a	8,8 \pm 0,2 AB a	196,4 \pm 5,2 A a	24,1 \pm 0,2 B a
	I + D 36,4 \pm 0,8 BC a	1,904 \pm 0,07 C a	8,0 \pm 0,1 CD a	192,2 \pm 7,0 A b	22,0 \pm 0,3 BCD a
	A 37,4 \pm 1,3 B a	1,788 \pm 0,06 C a	7,7 \pm 0,2 CD b	180,7 \pm 3,2 AB a	22,6 \pm 0,9 BCD a
	A + I 21,4 \pm 1,2 D c	2,162 \pm 0,06 A a	8,2 \pm 0,3 BC a	118,4 \pm 7,8 C b	35,2 \pm 2,8 A a
	A + D 43,6 \pm 1,4 A a	2,118 \pm 0,13 AB a	9,0 \pm 0,3 A a	202,7 \pm 7,5 A a	20,6 \pm 0,4 CD a
	A + I + D 36,8 \pm 1,4 B a	1,911 \pm 0,05 C a	7,4 \pm 0,2 DE a	201,0 \pm 6,2 A a	20,2 \pm 0,7 D a
48H	C. N. 31,6 \pm 0,5 E a	1,733 \pm 0,08 B b	8,3 \pm 0,1 AB a	172,6 \pm 7,6 D b	25,4 \pm 0,5 A ab
	C. P. 40,0 \pm 1,0 B a	1,808 \pm 0,04 AB a	8,5 \pm 0,2 A a	219,5 \pm 3,8 AB a	20,5 \pm 0,2 B b
	I 35,4 \pm 0,9 BCDE a	1,877 \pm 0,09 AB a	7,7 \pm 0,3 BC a	192,0 \pm 12,8 BCD a	21,9 \pm 0,8 B a
	D 37,3 \pm 0,9 BCD a	1,756 \pm 0,02 B a	8,2 \pm 0,1 AB a	214,8 \pm 3,0 B a	21,6 \pm 0,5 B ab
	I + D 34,3 \pm 0,6 CDE a	1,539 \pm 0,03 C b	7,3 \pm 0,2 C b	222,7 \pm 6,3 A a	21,7 \pm 0,7 B a
	A 40,6 \pm 1,1 B a	1,884 \pm 0,06 AB a	8,5 \pm 0,1 A a	207,7 \pm 9,0 BC a	22,9 \pm 0,7 AB a
	A + I 49,5 \pm 7,7 A a	1,961 \pm 0,04 A b	8,2 \pm 0,1 AB a	243,4 \pm 39,5 A a	17,3 \pm 2,6 C b
	A + D 39,0 \pm 1,0 BC ab	2,001 \pm 0,07 A ab	8,3 \pm 0,3 AB a	181,6 \pm 7,3 CD a	21,4 \pm 0,5 B a
	A + I + D 32,6 \pm 1,0 DE a	1,801 \pm 0,06 AB a	7,2 \pm 0,2 C ab	181,3 \pm 4,0 CD a	20,9 \pm 0,6 B a
Valor de F	5.69	6.33	8.66	4.16	8.09
Pr > F	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
C.V	13.69	9.52	8.13	15.00	11.97

Por outro lado, analisando os diferentes tratamentos 6 HPI, tilápias dos grupos (I), (D), (I+D), (A+I), (A+D) e (A+D+I) quando comparados aos peixes do grupo controle positivo (C.P) apresentaram maiores valores de eritrócito e menores valores de hemoglobina, seguido pela diminuição CHCM.

Animais que foram administrados aloxano associado à insulina 24 HPI em relação ao (C.P), tiveram menores valores no hematócrito, maiores contagens de eritrócitos e de hemoglobina, seguida por diminuição do volume corpuscular médio e aumento do CHCM.

5.3 Avaliação bioquímica

Estudos glicêmicos realizados revelaram que administração de aloxano resultou em maiores valores de glicose no sangue das tilápias, concentrações sanguíneas cerca de 10 vezes maiores 6 HPI em relação à maioria dos tratamentos (Figura 22). No estudo de glicemia 24 e 48 HPI, observou-se o efeito glicocorticoide da dexametasona, resultando em maior valor glicêmico dos peixes. Entretanto, estes efeitos foram menores em animais tratados conjuntamente com insulina e/ou aloxano.

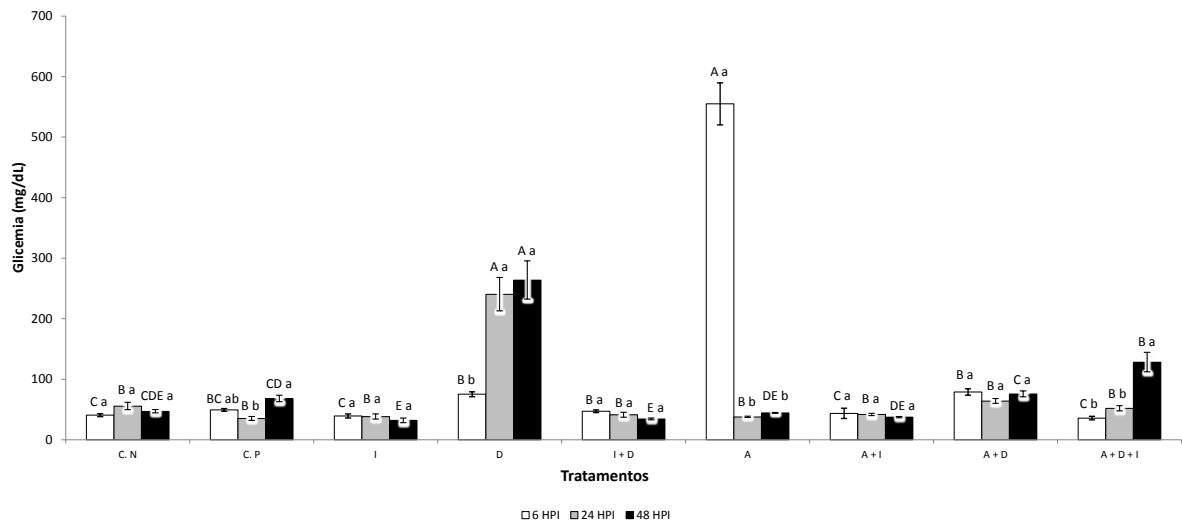


Figura 22 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio da glicemia de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C.N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloaxano (A); Aloaxano e insulina (A+I); Aloaxano e dexametasona (A+D); Aloaxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

Em relação aos valores de triglicerídeos no sangue (Figura 23), observou-se que peixes de grupos inoculados com salina (C.N) apresentaram maiores valores comparados as tilápias inoculadas com *A. hydrophila* (C.P) 48 HPI. Por outro lado, na comparação entre grupos submetidos a aerocistite por *A. hydrophila*, peixes tratados com aloxano (A) 6 HPI apresentaram maiores níveis circulantes de triglicerídeos em relação aos demais grupos, observado também o mesmo efeito em peixes tratados com dexametasona (D) 24 HPI. Entretanto, os peixes dos grupos

(I+D), (A) e (A+D+I) apresentaram menores níveis de triglicerídeos em comparação aos demais grupos 48 HPI.

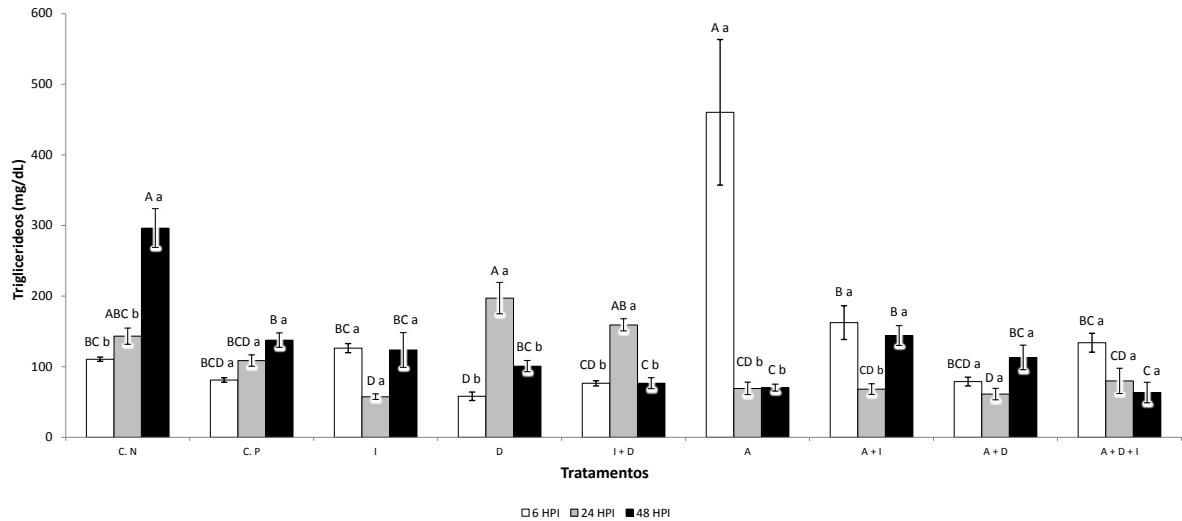


Figura 23 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de triglicerídeos em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C.N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

Na comparação os valores de colesterol (Figura 24), observou-se que após estímulo inflamatório, tanto por solução salina e/ou por *A. hydrophila* os níveis de colesterol aumentaram no tempo, sendo este efeito mais expressivo em peixes controle inoculados *A. hydrophila* (C.P) quando comparado as tilápias inoculadas salina (C.N), mantendo perfil de resposta semelhantes 24 e 48 HPI. Da mesma forma, observou-se maiores valores ao longo do tempo nos peixes dos grupos (I), (D), (I+D), (A+D) e (A+D+I), apresentando valores mais elevados em peixes tratados com dexametasona (D). Porém, notou-se que animais (A) e (A+I) obtiveram maiores valores de colesterol 6 HPI, havendo diminuição ao longo de tempo.

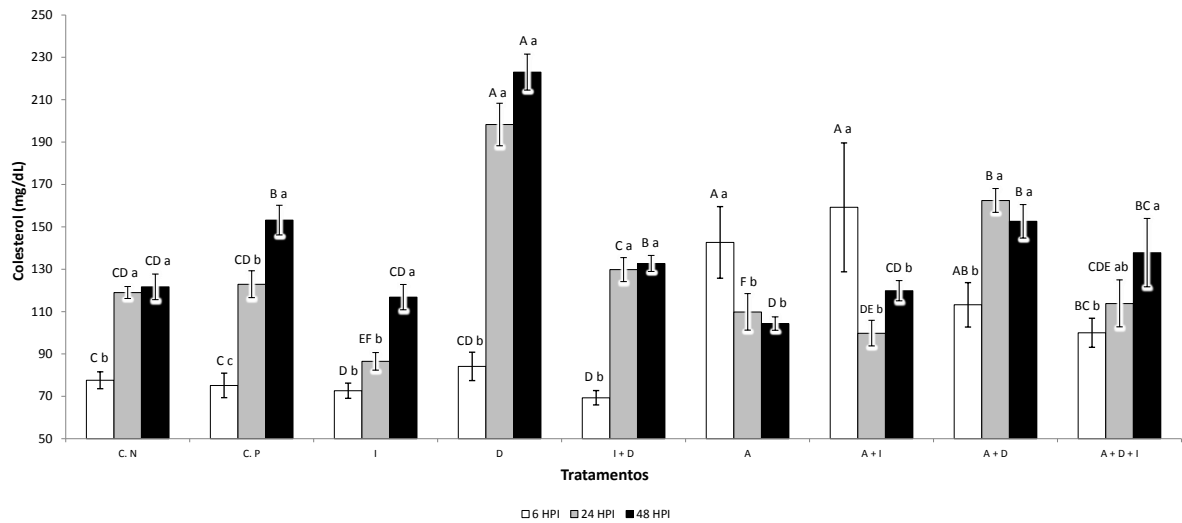


Figura 24 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de colesterol em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C.N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

Valores de fosfatase alcalina revelaram, de modo geral, aumento de atividade enzimática sérica em peixes tratados com aloxano 6, 24 e 48 HPI (Figura 25).

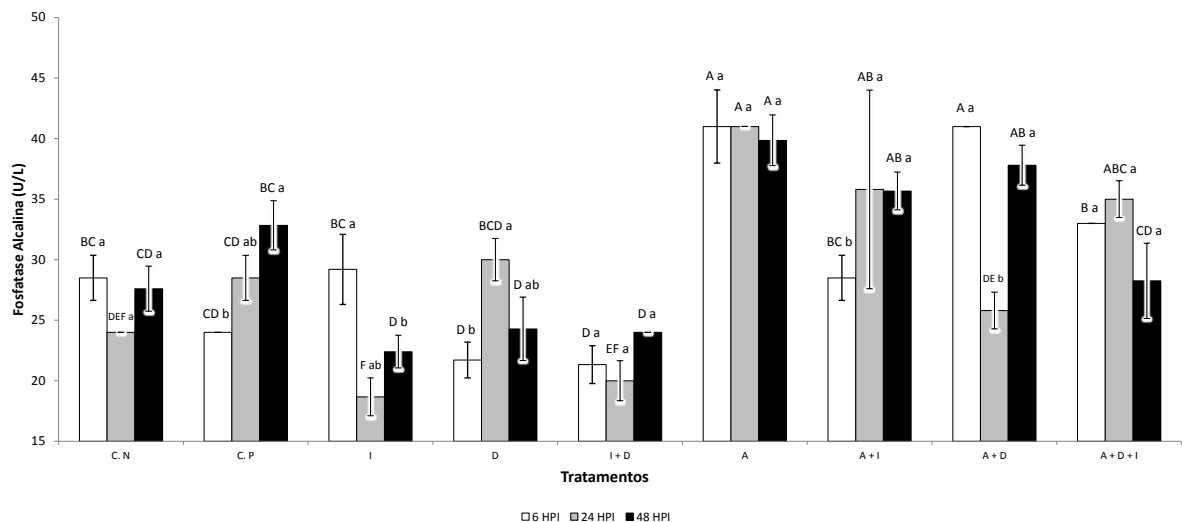


Figura 25 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de fosfatase alcalina em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C.N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0001.

Notou-se aumento de proteína total após estímulo inflamatório, tanto por solução salina e/ou por *A. hydrophila* ao longo do tempo (Figura 26). Do mesmo modo este efeito foi observado nos peixes de grupos (D) e (I+D). Nas tilápias dos tratamentos (A+I), (A+D) e (A+D+I) observou-se manutenção de valores elevados durante todo tempo. Porém nas tilápias tratadas com insulina (I) observou-se diminuição de valores ao longo do tempo.

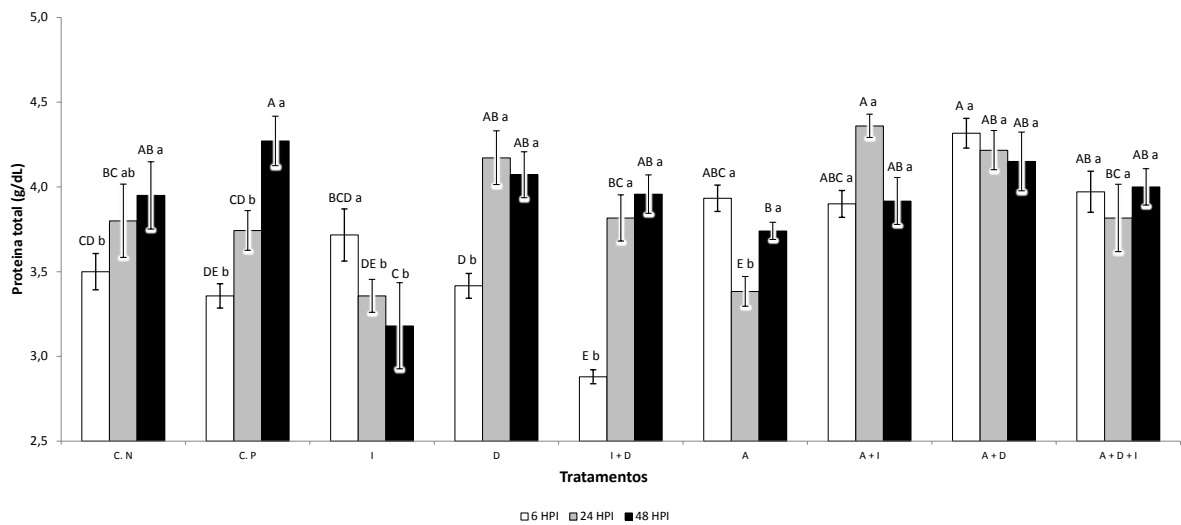


Figura 26 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de proteína total em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C.N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. $P > F < .0001$.

Em relação a análise de albumina (Figura 27), observou-se que animais tratados com aloxano e insulina (A+I) aumentaram os valores circulantes desta proteína quando comparados aos peixes controles (C.P) 24 HPI. Entretanto, não se observa alterações significativas ($P > 0,05$) nos demais grupos.

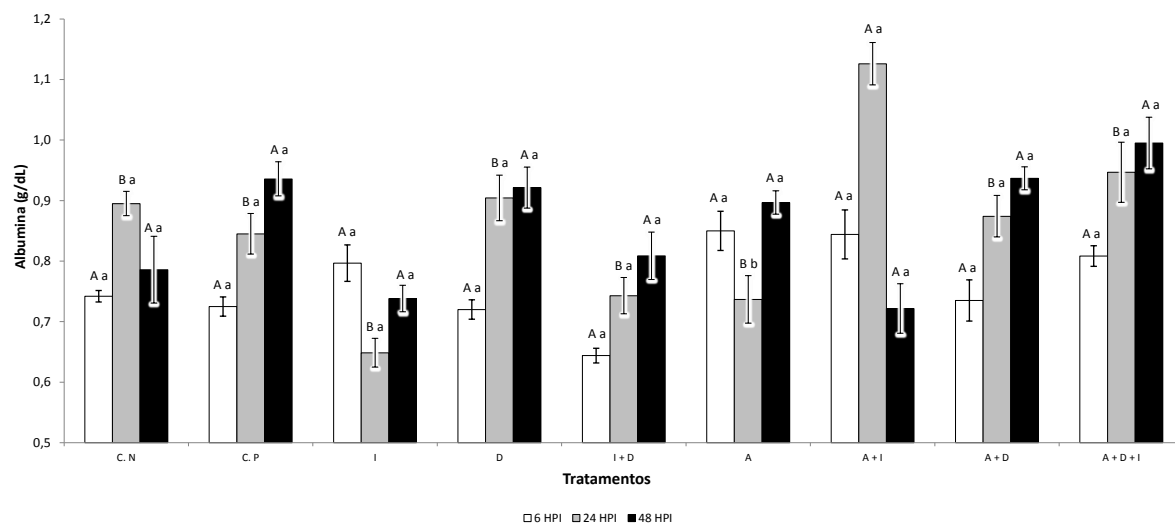


Figura 27 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio de albumina em tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina como desafio (C.N); Controle positivo (C.P); Insulina (I); Dexametasona (D); Insulina e dexametasona (I+D); Aloxano (A); Aloxano e insulina (A+I); Aloxano e dexametasona (A+D); Aloxano, dexametasona e insulina (A+D+I)}. Pr>F <.0012.

5.4 Estudo do índice hepático, esplênico e renal somático

Resultados observados no estudo hepatossomático em tilápias submetidas aos diferentes tratamentos e induzida inflamação por *A. hydrophila* (Figura 28). Na fase aguda da reação inflamatória 6 HPI, notou-se menor valor somático no fígado de tilápias tratadas com aloxano quando comparadas aos peixes dos demais tratamentos. No entanto, os peixes que tiveram a associação do aloxano à insulina e/ou dexametasona não apresentaram tais efeitos. 24 HPI e 48 HPI, peixes submetidos à injeção de solução salina (C.N) resultou em aumento gradativo nos valores somáticos hepáticos. Diferentemente de peixes aloxano-diabéticos submetidos aerocistite bacteriana, tratados com aloxano (A) 6 e 48 HPI e das associações A+I e A+D+I 24 e 48 HPI, que apresentaram diminuições expressivas nos valores somáticos dos tecidos hepáticos em relação aos peixes controles inoculados *A. hydrophila* (C.P).

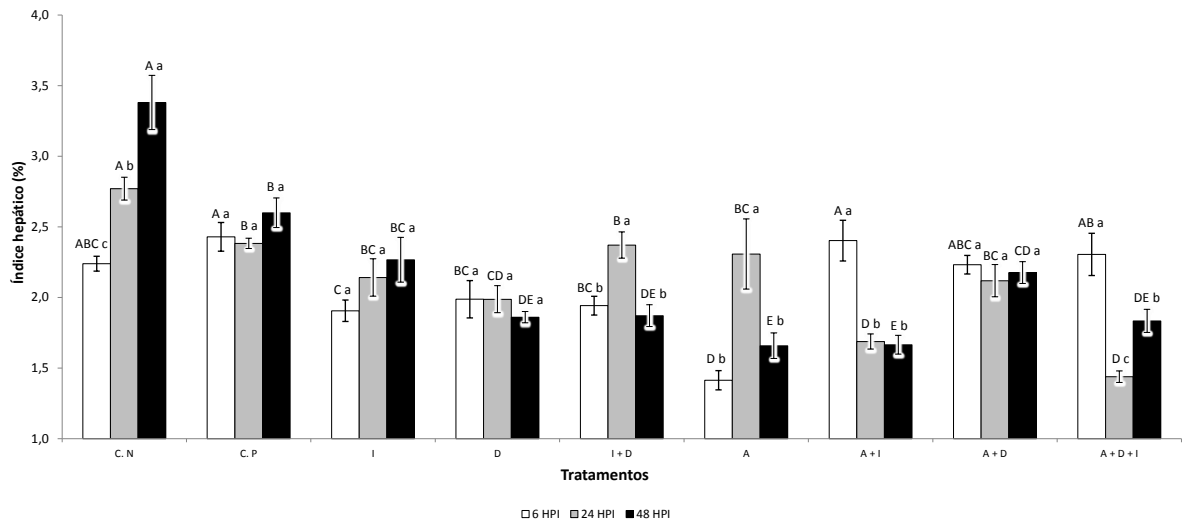


Figura 28 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio da relação hepato-somático de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina (**C.N**); Controle positivo (**C.P**); Insulina (**I**); Dexametasona (**D**); Insulina e dexametasona (**I+D**); Aloxano (**A**); Aloxano e insulina (**A+I**); Aloxano e dexametasona (**A+D**); Aloxano, dexametasona e insulina (**A+D+I**)}. $Pr > F < .0001$.

Os resultados do estudo esplenossomático de tilápias submetidas aos diferentes tratamentos estão expressos na Figura 29. Na fase aguda da reação inflamatória 6 HPI, observou-se menores valores somáticos esplênicos em tilápias do grupo (C.P) quando comparadas aos peixes do grupo (C.N), no entanto, observando o inverso 24 HPI. Destacam-se também em grupos tratados com dexametasona, menores índices esplênicos, sendo este efeito mais expressivo 48 HPI. No entanto, tilápias tratadas com aloxano (A) apresentaram aumento no tamanho esplênico durante todo o período experimental, sendo evidenciado efeito contrário pelo grupo (A+D).

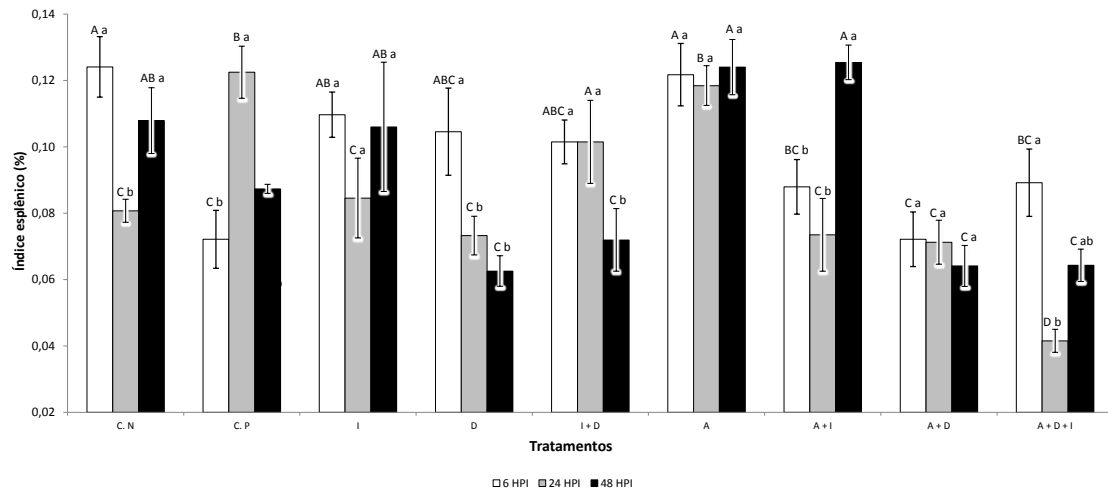


Figura 29 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio da relação espleno-somática de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina (**C.N**); Controle positivo (**C.P**); Insulina (**I**); Dexametasona (**D**); Insulina e dexametasona (**I+D**); Aloxano (**A**); Aloxano e insulina (**A+I**); Aloxano e dexametasona (**A+D**); Aloxano, dexametasona e insulina (**A+D+I**)}. $Pr > F < .0001$.

Os resultados da porção cranial do rim, denominada de rim cefálico, das tilápias submetidas aos diferentes tratamentos e a aerocistite por *A. hydrophila* estão expressos na Figura 30. Observou-se maiores valores em tilápias desafiadas com *A. hydrophila* e não tratadas (C.P) quando comparados aos peixes que obtiveram estímulos inflamatórios com solução salina, sendo este efeito mais proeminente com 24 e 48 HPI. Entretanto, tais efeitos não foram observados nos demais tratamentos, apesar de tilápias tratadas com insulina (I) apresentarem valores elevados no tempo de 48 HPI. Contudo, ao se relacionar animais dos grupos tratados com insulina (I), (I+D), (A+I) e (A+D+I) constatou-se menores valores somáticos na porção renal do rim quando comparado aos peixes somente inoculados com *A. hydrophila* 6 e 24 HPI.

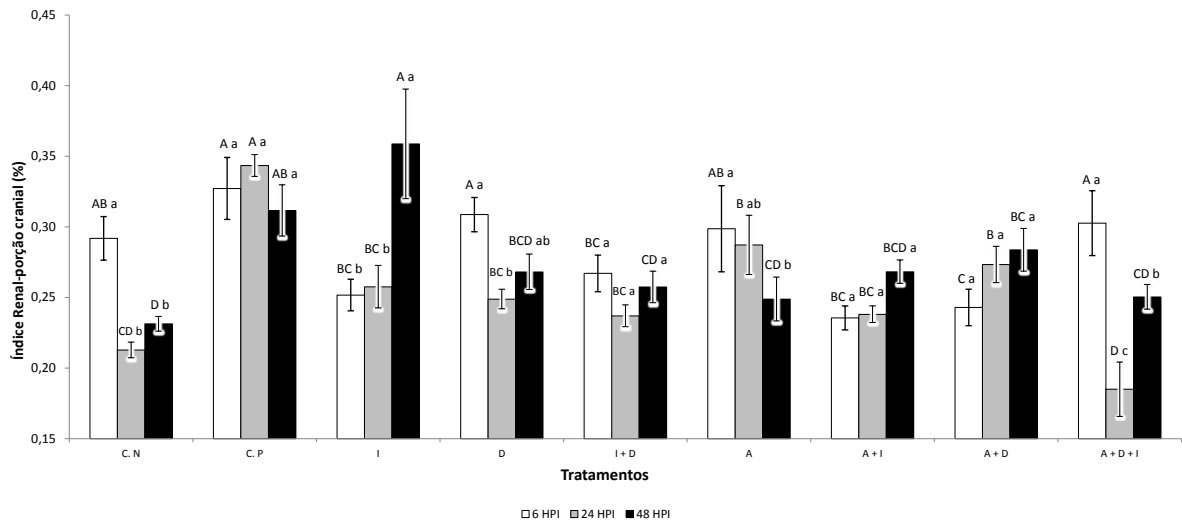


Figura 30 - Valores médios (n=7) e erro padrão médio da relação renal da porção cranial-somático de tilápias, *O. niloticus*, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. {Controle negativo, animais que receberam solução salina (**C.N**); Controle positivo (**C.P**); Insulina (**I**); Dexametasona (**D**); Insulina e dexametasona (**I+D**); Aloxano (**A**); Aloxano e insulina (**A+I**); Aloxano e dexametasona (**A+D**); Aloxano, dexametasona e insulina (**A+D+I**)}. Pr>F <.0001.

5.5 Avaliação do histopatológico

No estudo histopatológico da bexiga natatória resultante do estímulo inflamatório agudo (aerocistite) 6 HPI (Figura 31). Observou-se que tilápias inoculadas com salina apresentaram microscopicamente concentrações extensas de tecido fibroso no interior da bexiga natatória (serosa), tendo também a presença de poucos vasos com hiperemia ativa. Por outro lado, tilápias com inflamações induzida por *A. hydrophila*, apresentaram microscopicamente concentração de fibrina próxima ao lumem (conteúdo vividamente rosa homogêneo), infiltrado de células inflamatórias, vasos com hiperemia ativa e espessamento da serosa. Assim descrevendo um padrão de inflamação aguda fibrinossupurativa. Contudo, em tilápias tratadas com dexametasona não se observou infiltrado inflamatório do lado interno da serosa, e sim intensa proliferação de tecido fibroso.

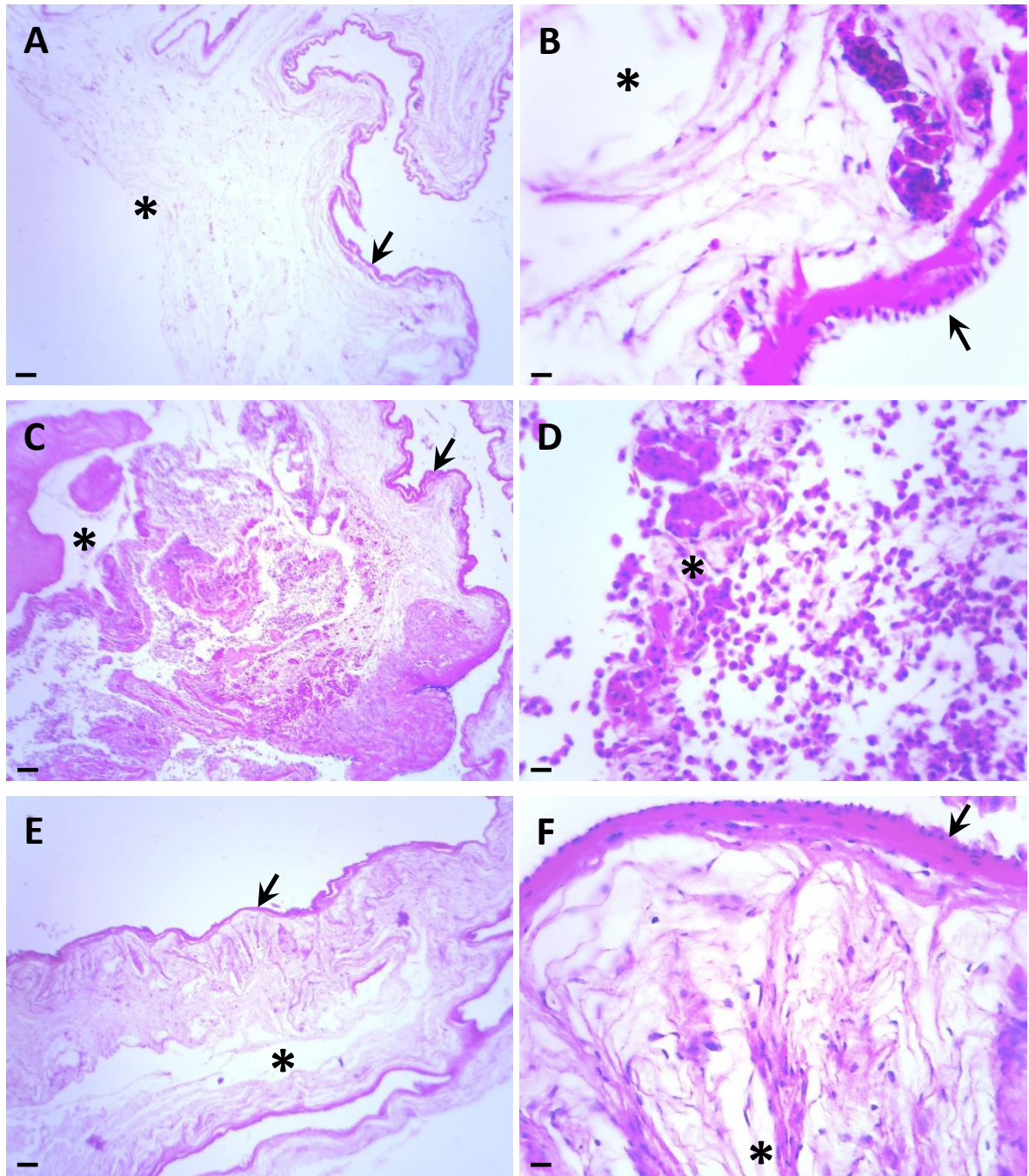


Figura 31 - Fotomicrografia da bexiga natatória em tilápias induzida aerocistite por solução salina 6 horas após inóculo (A – Barra= 100µm e B – Barra= 10µm); tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (C - Barra= 100µm e D – Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com dexametasona 6 horas após inóculo (E - Barra= 100µm e F – Barra= 10µm). Membrana serosa (seta) e lado interno (asterisco). Coloração HE.

Na avaliação histopatológica 48 HPI da bexiga natatória de tilápias com aerocistite (Figura 32), constatou-se que tilápias inoculadas com solução salina ocorreram concentrações de tecido fibroso do lado interno da serosa, mas em pouca quantidade quando comparado o mesmo tratamento com 6 HPI, sendo observado também a presença de poucos vasos. Entretanto, tilápias inoculadas com *A. hydrophila*, revelaram microscopicamente alta concentração de infiltrados celulares inflamatórios do lado interno da serosa, com muitos fragmentos celulares necróticos próximos ao lumem, grande número de vasos com hiperemia ativa do lado parietal da serosa e espessamento da mesma. Assim descrevendo um padrão de inflamação aguda supurativa. Por outro lado, em tilápias com inflamações por *A. hydrophila* e tratadas com dexametasona observou-se baixas concentrações de infiltrados celulares inflamatórios do lado interno da serosa, não apresentando aumento da espessura da membrana serosa e também não evidenciando a formação de neovascularização.

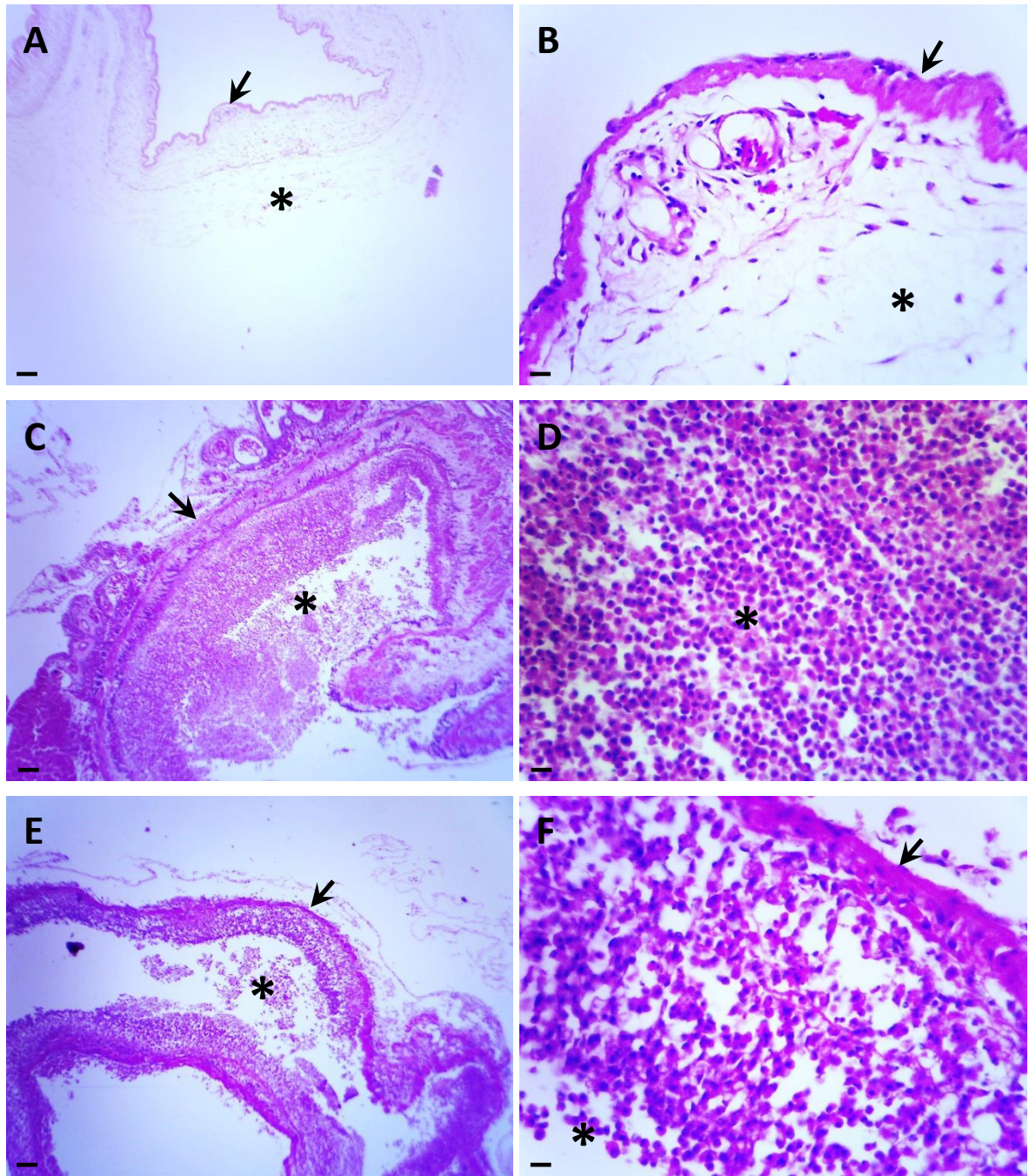


Figura 32 - Fotomicrografia da bexiga natatória em tilápias induzida aerocistite por solução salina 48 horas após inóculo (**A** - Barra= 100µm e **B** - Barra= 10µm); tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* 48 horas após inóculo (**C** - Barra= 100µm e **D** - Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com dexametasona 48 horas após inóculo (**E** - Barra= 100µm e **F** - Barra= 10µm). Membrana serosa (seta) e lado interno (asterisco). Coloração HE.

Na avaliação histopatológica 6 HPI da bexiga natatória de tilápias aloxano-diabéticas (Figura 33). Verificou-se que tilápias com e sem insulina, ocorreu concentrações de tecido fibroso do lado interno da serosa, no entanto tilápias aloxano-diabéticas que receberam tratamento com insulina observou-se grande número de neovasos com hiperemia ativa e espessamento da serosa.

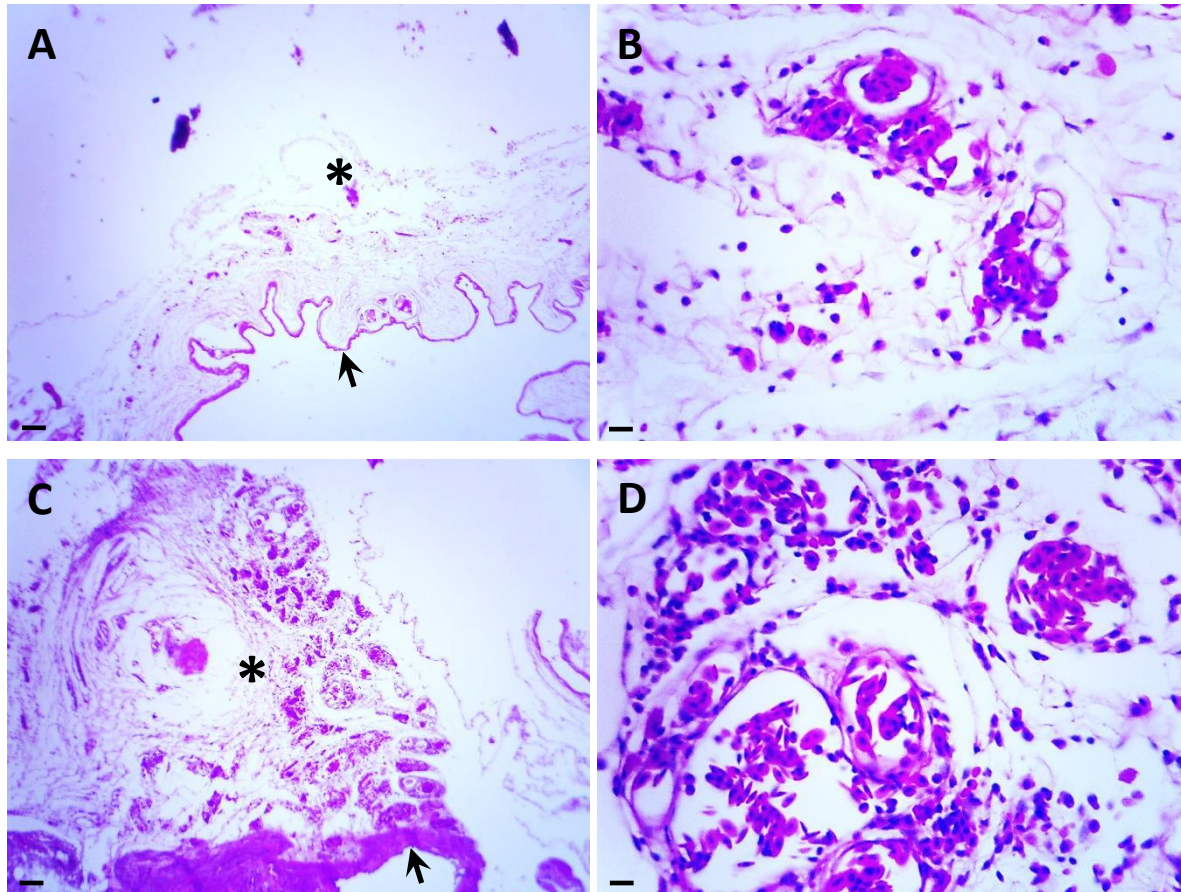


Figura 33 - Fotomicrografia da bexiga natatória em tilápias aloxano-diabéticas induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (**A** - Barra= 100µm e **B** – Barra= 10µm); tilápias aloxano-diabéticas induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com insulina 6 horas após inóculo (**C** - Barra= 100µm e **D** – Barra= 10µm). Membrana serosa (seta) e lado interno (asterisco). Coloração HE.

Na avaliação microscópicas da porção cranial renal das tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com insulina (Figura 34), observou-se aumento dos centros germinativos de células mononucleares (região cortical) e severa diminuição da região medular onde se encontra a proliferação de células granulocíticas e de eritrócitos.

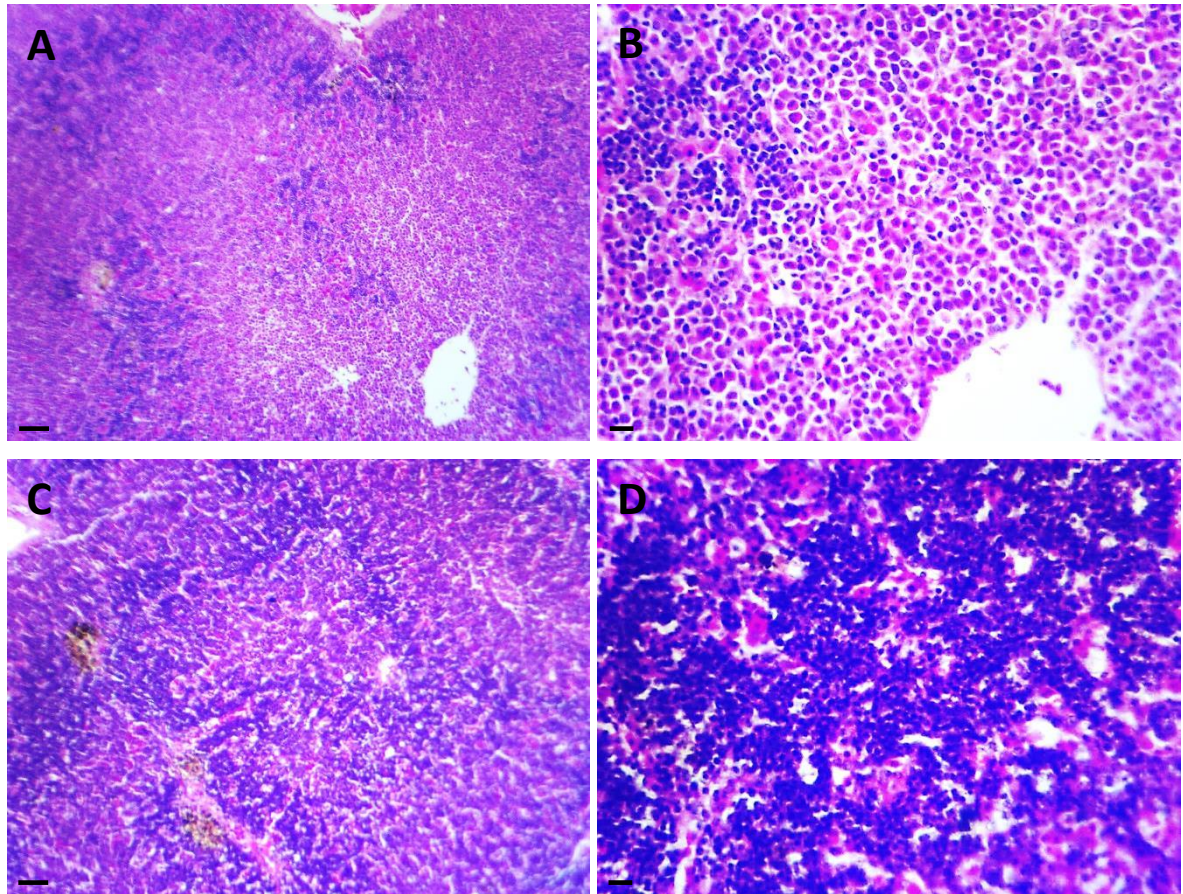


Figura 34 - Fotomicrografia da porção cranial renal em tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (**A** - Barra= 50 μ m e **B** - Barra= 10 μ m); tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratados com insulina 6 horas após inóculo (**C** - Barra= 50 μ m e **D** - Barra= 10 μ m). Coloração HE.

A histopatologia hepática de tilápias aloxano-diabéticas comparadas com tilápias normais 6HPI revelou perda de glicogênio e evidente acúmulo citoplasmático difuso de lipídios nos hepatócitos (Figura 35).

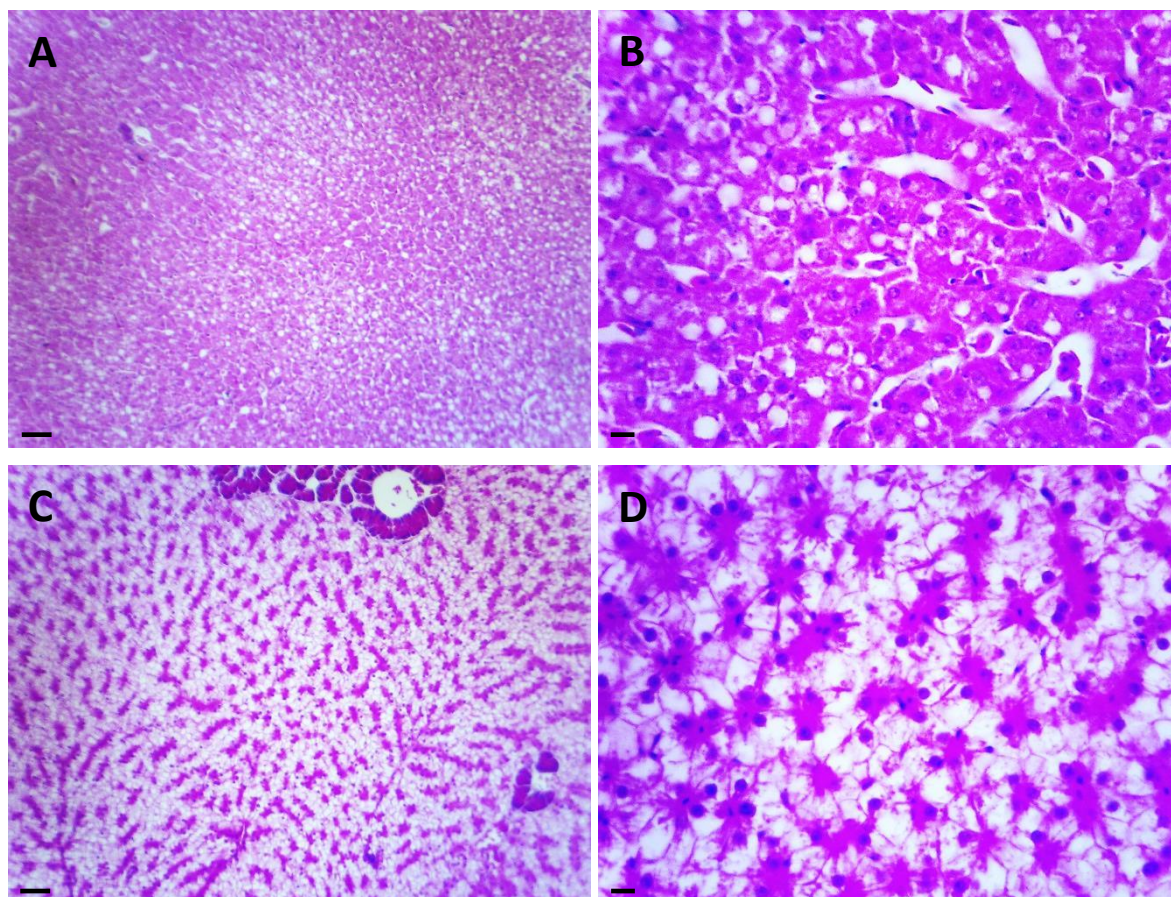


Figura 35 - Fotomicrografia hepática em tilápias aloxano-diabéticas induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (**A** - Barra= 50µm e **B** – Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* 6 horas após inóculo (**C** - Barra= 50µm e **D** – Barra= 10µm). Coloração HE.

No estudo histopatológico hepático (Figura 36), observou-se 48 HPI que tilápias com aerocistite por *A. hydrophila*, sem influência de qualquer tratamento farmacológico, a presença de pequeno número de células inflamatórias próximas à região centrolobular em comparação a tilápias inoculadas com solução salina. Do mesmo modo, tilápias inoculadas com *A. hydrophila* e tratadas com insulina apresentaram lesões inflamatórias intensas próximas à região centrolobular com evidente necrose e acúmulo proteico homogêneo vividamente rosa (eosinofílica). Caracterizando uma degeneração e necrose centrolobular inflamatória.

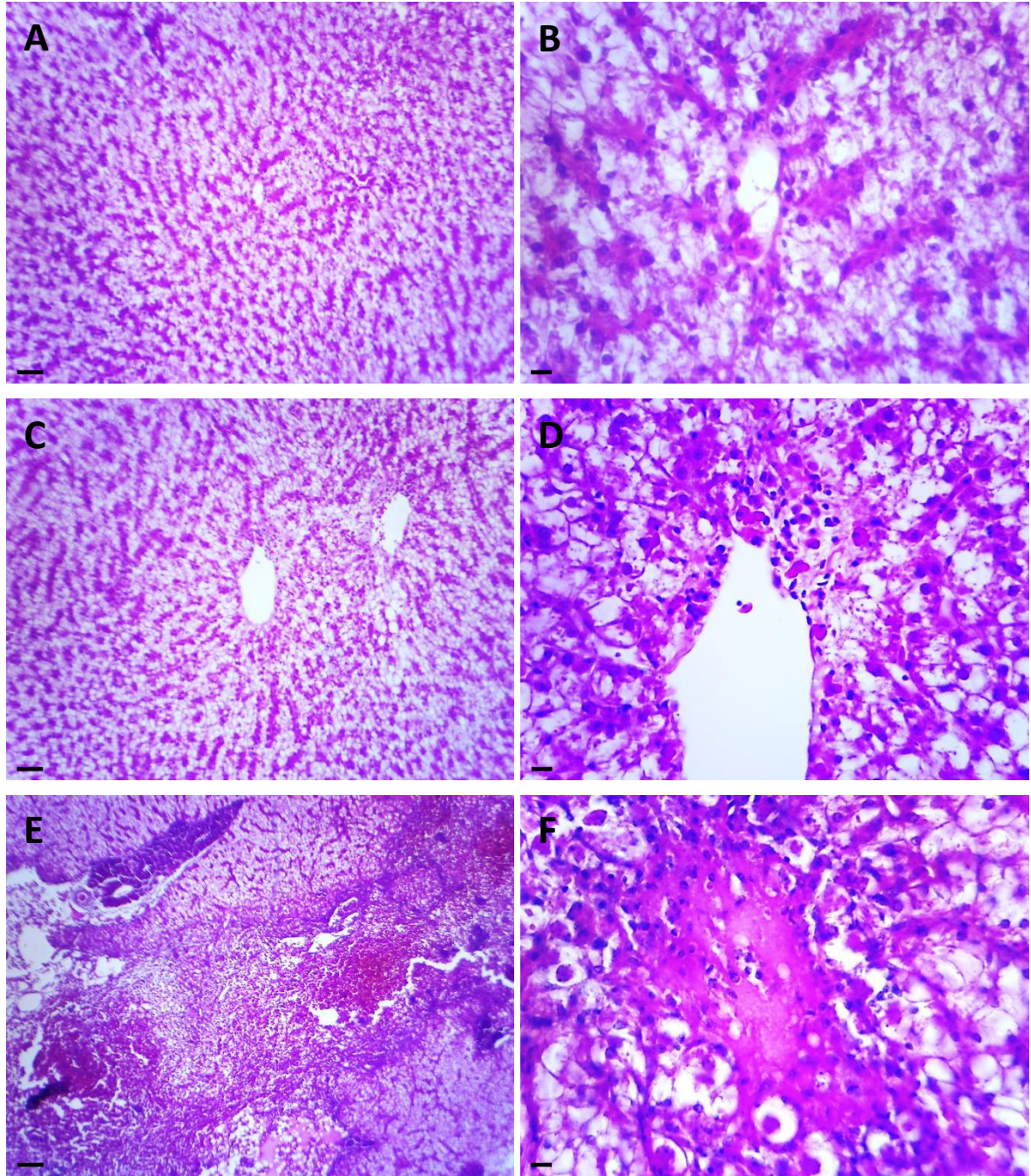


Figura 36 - Fotomicrografia hepática em tilápias induzida aerocistite 48 HPI. Tilápias induzida aerocistite por solução salina (**A** - Barra= 50µm e **B** – Barra= 10µm), tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* (**C** - Barra= 50µm e **D** – Barra= 10µm) e tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratadas com insulina (**E** - Barra= 50µm e **F** – Barra= 10µm). Coloração HE.

No estudo histopatológico branquial, observou-se 24 HPI que tilápias com aerocistite induzida por *A. hydrophila*, sem influência de tratamentos farmacológicos, a presença de grandes números de células inflamatórias na região do filamento entre as lamelas branquiais em comparação as tilápias inoculadas com solução salina (Figura 37). Do mesmo modo, tilápias tratadas com insulina apresentaram lesões inflamatórias intensas, obtendo grande acúmulo de células inflamatórias na região do filamento entre as lamelas branquiais observando também evidentes alterações patológicas da arquitetura nas lamelas e na fina camada óssea dos filamentos branquiais. Portanto revelando a diminuição da área respiratória lamelar em tilápias que foram induzidas aerocistite infecciosa por *A. hydrophila*.

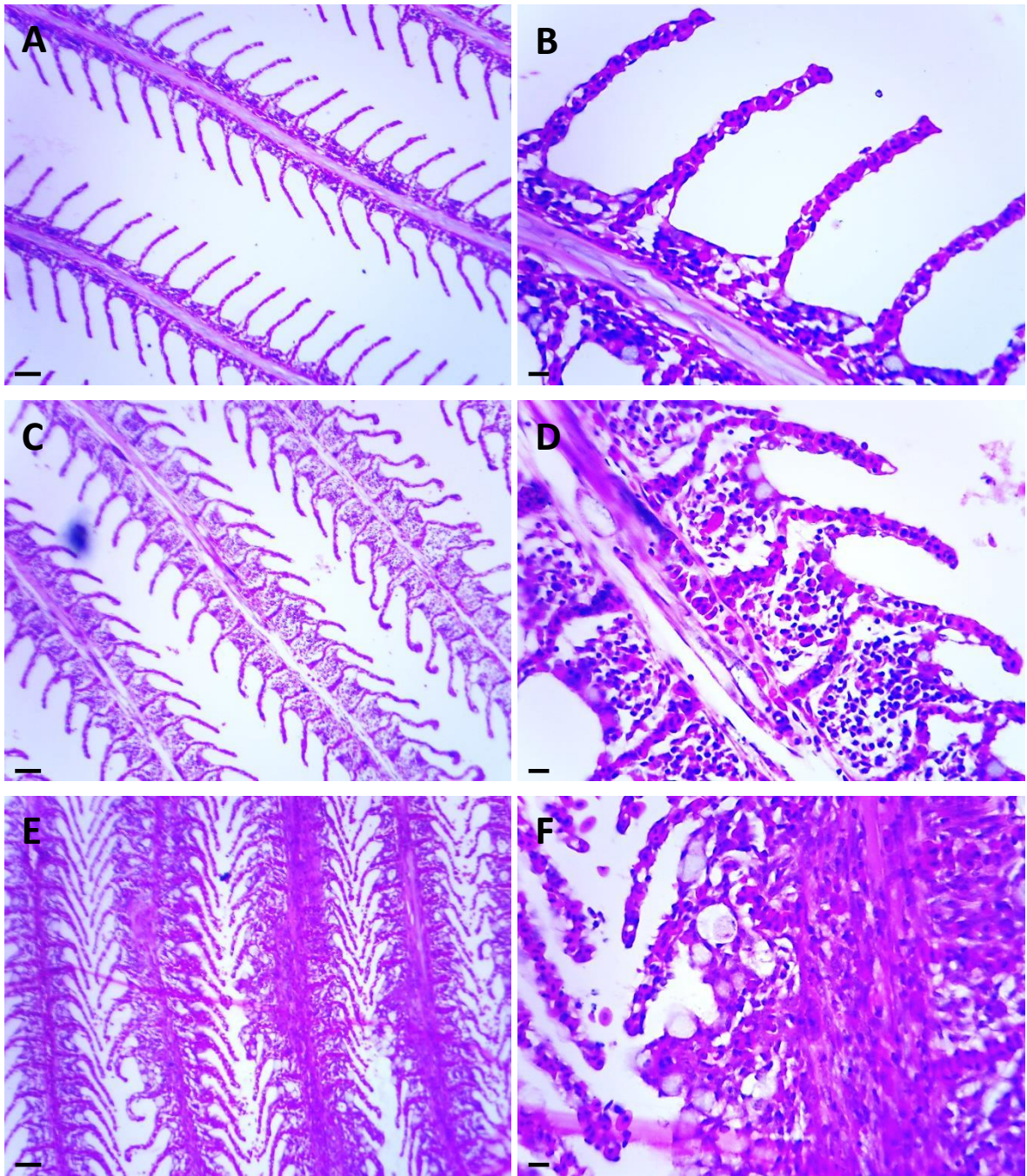


Figura 37 - Fotomicrografia de brânquias em tilápias induzida aerocistite 24 HPI. Tilápias induzida aerocistite por solução salina (**A** - Barra= 50 μ m e **B** – Barra= 10 μ m), tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* (**C** - Barra= 50 μ m e **D** – Barra= 10 μ m) e tilápias induzida aerocistite por *A. hydrophila* e tratadas com insulina (**E** - Barra= 50 μ m e **F** – Barra= 10 μ m). Coloração HE.

A histopatologia da musculatura esquelética de tilápias aloxano-diabéticas comparadas com tilápias normais (Figura 38) revelaram perda severa de tecido muscular esquelético, tendo aumento dos números de adipócitos e grande quantidade de tecido fibroso entre as miofibras. Da mesma forma, tilápias aloxano-diabéticas e tratadas com dexametasona apresentaram necrose das miofibras difusa por todo tecido muscular esquelético com caracterizando rbdomiólise aguda severa.

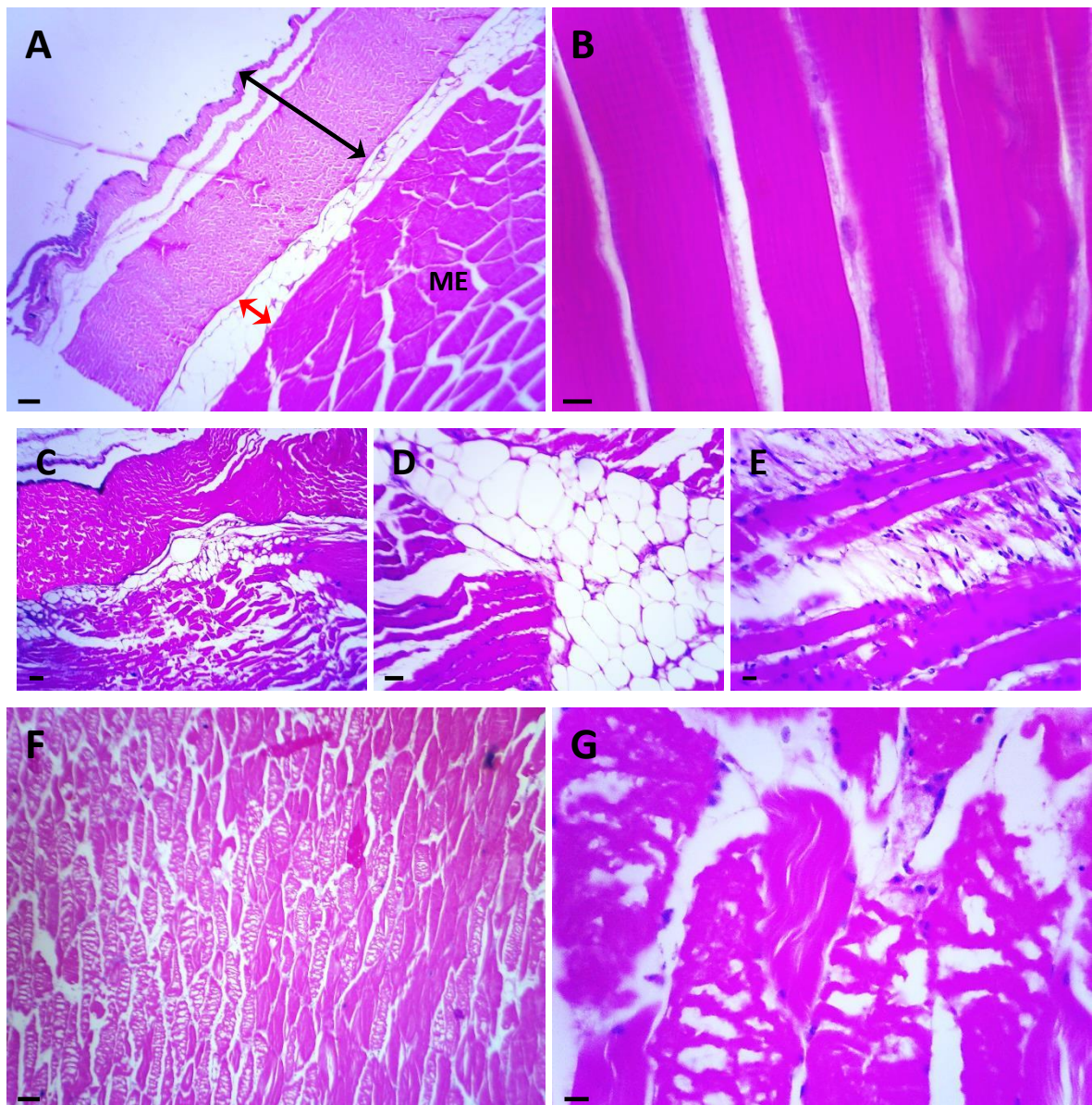


Figura 38. Fotomicrografia do músculo esquelético (ME) de tilápia normal (A - Barra= 100 μ m e B – Barra= 5 μ m); tilápia aloxano-diabética (C - Barra= 100 μ m, D – Barra= 50 μ m, E– Barra= 10 μ m) e tilápia aloxano-diabética tratado com dexametasona (F - Barra= 100 μ m e G – Barra= 10 μ m). Tegumento (seta preta) e subcutâneo (seta vermelha). Coloração HE.

5.6 Estudo clínico e patológico em tilápias aloxano-diabéticas

No aspecto clínico-patológico de tilápias que receberam aplicações via endovenosa de aloxano, observou-se na necropsia 24 horas após administração, formações císticas no tecido hepático, com conteúdo interno de coloração vermelho-enechado, estes localizados nas regiões cranial, médio e caudal do fígado (Figura 39). Do mesmo modo, tilápias aloxano-diabéticas apresentaram em relação ao globo ocular: exoftalmia e opacidade difusa na córnea após 3 dias da administração endovenosa de aloxano (Figura 40). Observou-se também que em algumas tilápias aloxano-diabéticas houve severa diminuição da musculatura esquelética duas semanas após administração endovenosa de aloxano (Figura 41).



Figura 39 - Alteração hepática em tilápias aloxano-diabéticas 24 horas após indução.



Figura 40 - Alterações do globo ocular em tilápias aloxano-diabéticas 3 dias após indução.



Figura 41 - Perda da musculatura esquelética em tilápias aloxano-diabéticas 2 semanas após indução (A e B).

6. DISCUSSÃO

A avaliação do acúmulo celular na aerocistite revelou-se predomínio de neutrófilos no local inflamado em todos os tempos estudados, sendo estas alterações mais significativas 24 HPI, demonstrando assim em teleósteos o importante papel de neutrófilos na reação inflamatória aguda conforme já descrito em mamíferos, (KATZENBACK e BELOSEVIC, 2009). A maior presença de neutrófilos no exsudato corrobora com achados histopatológicos em que microscopicamente notou-se um padrão de inflamação aguda fibrinossupurativa em relação aos animais inoculados com solução salina. Da mesma forma, estudo de Endo et al. (1997) demonstrou a predominância de neutrófilos na aerocistite bacteriana. Fenômeno decorre da presença de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa da bactéria aeromonas, descrito como potente quimiotático para neutrófilos (FREUNDENBERG et al., 1984). Segundo Swain et al. (2008), à injeção de LPS em peixes atribui habilidade aos macrófagos para produzirem interleucina1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), estes são responsáveis por quimiotaxia, ativação de leucócitos e expressão de moléculas de adesão endotelial.

Os LPS de bactérias gram-negativas exerce um papel preponderante na ativação e amplificação da resposta inflamatória (MUNFORD, 2006), ao se ligar à glicoproteína de membrana CD14 e iniciar a ativação de uma cascata de sinalização celular pela fosforilação de diversos elementos (COHEN, 2002; BAPTISTE, 2007). Resumidamente, o LPS liga-se a uma proteína de fase aguda, denominada proteína de ligação ao lipopolissacarídeos formando um complexo 1.000 vezes mais ativo que o LPS livre (MATHISON et al., 1992). Este complexo, por sua vez, liga-se ao CD14, expressa por macrófagos e outras células monocíticas (WRIGHT et al., 1990; ROITT et al., 2003). A ativação da célula é resultado da transferência do sinal do LPS dos receptores CD14 para estruturas denominadas *Toll-like Receptors* (TLR), receptores de reconhecimento de padrão (PRR) que identificam padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (COHEN, 2002; ZANONI et al., 2011).

Existem dois fatores que explicam a rapidez com a qual o sistema imune inato responde à invasão de um patógeno. A presença de receptores, como os

TLR, que reconhecem alguns marcadores de microorganismos (LPS, por exemplo) e a vasta distribuição desses receptores no corpo. Além das células imunológicas (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos), existe também a presença em células epiteliais, endoteliais e miócitos (LEWIS et al., 2012). Os principais alvos desses PRRs são os PAMPs como o LPS e o ácido lipoteicóico (LEWIS et al., 2012; TSUJIMOTO et al., 2008). O primeiro PRR ativado durante qualquer interação patógeno-hospedeiro são os membros da família dos TLR que são responsáveis pelo reconhecimento de produtos microbianos e a indução da resposta inata e adaptativa (ZANONI et al., 2011). O complexo formado pelo LPS, CD14 e o TLR inicia uma série de eventos intracelulares envolvendo proteínas e fatores de transcrição que serão responsáveis em transcrever diversos genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas como a cicloxigenase 2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (AKIRA, TAKEDA, KAISHO, 2001; TAKEDA, KAISHO, AKIRA, 2003).

Do mesmo modo em que foi crescente o acúmulo de neutrófilos no exsudato causado por *A. hydrophila* ao longo do tempo em animais controles não tratados, ficou evidente a diminuição de neutrófilos (neutropenia) no leucograma, corroborando estes achados de Reque et al, (2010) e Moraes et al, (2013). Atentando-se as alterações de neutrófilos tanto no acúmulo exsudativo e/ou no leucograma e correlacionando aos tratamentos com ou sem insulina, observou-se uma correspondência com alterações renais na porção cranial, demonstrando que o tratamento com insulina resultou em menor índice somático renal na porção cranial, com perda severa do tecido na região medular, acompanhado de maior acúmulo de neutrófilo no exsudato e maior números de neutrófilos no sangue 6 e 24 HPI. Esta correlação também foi relatada por Suzuki e Hibiya (1988) que observaram rápida infiltração de neutrófilos no sítio lesado, neutrofilia no sangue e diminuição do número de neutrófilos no tecido linfóide renal (região medular). Da mesma forma, animais tratados unicamente com insulina apresentaram no foco inflamatório maior acúmulo de neutrófilos (6 e 24 HPI), linfócitos (6 HPI), macrófagos (6 e 48 HPI) e microscopicamente aumento significativo dos centros germinativos de células mononucleares (região cortical) dentre 6 HPI. Assim reforçando a posição de que a insulina desempenhe importante papel na resposta imune inata durante reação

inflamatória aguda, sendo um importante hormônio pró-inflamatório, segundo descrito por Garcia Leme (1982,1989) e Moraes et al, (1987). Segundo Costa Rosa et al., (1996), a adição de insulina a fagócitos de animais não-diabéticos *in vitro* foi capaz de aumentar a fagocitose de zymosan por macrófagos peritoneais (COSTA ROSA et al., 1996). Neutrófilos e monócitos de indivíduos não-diabéticos, mas com hiperinsulinemia, apresentaram aumento na quimiotaxia, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio após estímulo com "*phorbol-12-myristate-13-acetate*" (WALRAND et al., 2006).

O efeito imunossupressor da dexametasona evidenciou-se neste experimento, revelando linfopenia (6 e 24 HPI) e monocitopenia (24 e 48 HPI), seguido pela ausência de macrófagos no exsudato durante a evolução da reação inflamatória infecciosa em relação a peixes apenas submetidos a estímulo inflamatório por *A. hydrophila*. Efeito semelhantes foram descrito em estudos de Robertson et al. (1963), Mcleay (1973), Nguyen e Lim (1998), Belo et al. (2005), Belo et al. (2011), Moraes et al. (2013) e Claudiano et al. (2013).

A ação anti-inflamatória da dexametasona também foi observado na avaliação microscópica da bexiga natatória 6 HPI, apresentado por formação somente de tecido fibroso e sem presença de leucócitos no foco inflamado corrobora aos achados de Claudiano et al. (2013), que descreveram na fase inicial da inflamação, o bloqueios na formação de edema, vasodilatação, quimiotaxia leucocitária e impedindo também a neovascularização. Segundo Tenius et al. (2007), o uso dexametasona reduz o número de células inflamatórias em feridas cutâneas nos tempos iniciais em estudo do processo cicatricial.

É carente de informações sobre a ação de mediadores químicos envolvidos nos elementos celulares da reação inflamatória em teleósteos. Entretanto, já foi descrita em peixes a presença de mediadores derivados do ácido araquidônico, tais como prostaglandinas e leucotrienos (PETTITT e ROWLEY, 1991), prostaciclina e tromboxanos (THOMSON et al., 1998; SECOMBES et al., 2001; FUJIMORIA, 2011). Estes são responsáveis em sinalizar e modular a reação inflamatória tecidual e celular nos mamíferos (LEES et al., 2004). Diante destes fatos e visto que a dexametasona é um glicocorticóide esteroide com potente ação anti-inflamatória, acreditando-se que seu modo de ação esteja relacionado à indução da síntese de

lipocortina, capaz de inibir a síntese de fosfolipase A2 e, conseqüentemente, bloqueando a conversão enzimática de fosfolípídeos da membrana celular em ácido araquidônico, impedindo a formação de eicoisanóides (BOOTH, 2003; GILMAN, 2010). Estes estudos auxiliam no entendimento do efeito glicocorticóide da dexametasona observado em tilápias com a inibição da formação dos eicosanóides e liberação de enzimas pro-inflamatórias, conseqüentemente diminuindo a migração de leucócitos para o foco lesado.

No entanto, há diminuição do efeito imunossupressor da dexametasona na avaliação 48 HPI, por apresentar maior acúmulo de linfócitos na bexiga natatória e acompanhado microscopicamente por concentrações de infiltrados celulares inflamatórios na mesma. Segundo Pickering, (1984, 1981), agentes estressores causam aumento dos níveis de corticosteroide em peixes, com significativa linfocitopenia 8 horas após, no entanto, este efeito imunossupressor não é observado 72 horas após estresse. Segundo Rang et al., (2001), a dexametasona dentre os corticosteróides apresenta maior potência anti-inflamatória, sendo assim, com maior afinidade pelo receptores de glicocorticoides. Este fármaco é metabolizado pelo fígado, sendo mais de 50% desta droga excretado pela urina dentre 24 horas, obtendo sua meia-vida tecidual de aproximadamente dois dias em mamíferos (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007). Neste contexto, podemos concluir que o aumento de linfócitos nas 48 HPI no foco inflamado deve-se a perda do efeito imunossupressor da dexametasona.

O efeito glicocorticóide da dexametasona sobre o metabolismo intermediário das tilápias resultou em aumento de glicose e colesterol no sangue, seguida de diminuição do tecido hepático quando comparado a animais submetidos a apenas estímulo inflamatório por *A. hydrophila*, corroborando os resultados descritos por Belo et al, (2011) para este mesmo teleósteo. Durante o estresse em peixes, igualmente a mamíferos, estímulos de liberação de catecolaminas na corrente sanguínea ocorrem conjuntamente a ação dos glicocorticóides, promovendo maior disponibilização de glicose para o organismo (hiperglicemia), através da glicogenólise hepática, degradação de proteínas musculares para formação de aminoácidos que por sua vez são convertidas em glicose no fígado (gliconeogênese) e mobilização de gordura corporal (lipólise), preparando o organismo para situações de estresse (MAZEAUD et al, 1977; HIGUERA e CARDENAS, 1986; ROBERTSON et al, 1987; BARTON e IWAMA, 1991; VIJAYAN E MOON, 1994; WENDEELAR

BONGA, 1997; MOMMSEN et al., 1999). Dessa forma, a patogênese dessa hiperglicemia é multifatorial, pois em situações de estresse induzido, a elevação dos níveis de hormônios contrarregulatórios é bem comum, representado pelas elevações na concentração de catecolaminas, glucagon, cortisol, hormônio de crescimento (GH) condições que resulta glicogenólise hepática e aumento da gliconeogênese (BRIERRE et. al., 2004).

Em relação à utilização de aloxano para tornar as tilápias-diabéticas, notou-se inicialmente, alterações clínico-patológicas após administração de aloxano via endovenoso, sendo assim observado exoftalmia, opacidade difusa na córnea e formações císticas no tecido hepático. Segundo Xu et al., (2004), a administração de aloxano via endovenosa acarreta a indução de diabetes em tilápias com formações de focos necróticos em tecidos hepáticos. O aloxano por injeção intravenosa destrói seletivamente as células β pancreáticas, sendo captadas rapidamente pelos transportadores de glicose (GLUT2) e causando formação de radicais livres após uma série de reações que culminam com a lesão celular (JÖRNS et al., 1997 SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008). Tilápias apresentam hepato-pâncreas, fato confirmado pela marcação de ilhotas pancreáticas produtoras de insulina pelo método imunohistoquímico (MORRISON et al., 2007). Neste sentido, a administração de aloxano via endoflébica causa lesões no tecido hepático de tilápias. Em relação às alterações do globo ocular, estudos em ratos diabéticos demonstraram processos degenerativos, alterações hemodinâmicas e alterações na barreira na microcirculação (PUGLIESE et al., 1989; CALDWELL E FITZGERALD, 1991; RODRIGUES et al., 2004). Acredita-se que estas alterações estejam relacionadas à mudança do nível glicêmico, acarretando aumento de depósito de glicogênio nas organelas citoplasmática das células endoteliais do globo ocular, levando a quadro de degeneração e refletindo na ocorrência da disfunção no transporte de substâncias do interstício para o lúmen vascular.

Em linhas gerais, a avaliação hepática duas semanas após administração de aloxano em tilápias resultou em diminuição no índice somático hepático com perda de glicogênio e com sugestivo acúmulo difuso de lipídios nos citoplasma dos hepatócitos, acompanhado pelo aumento dos valores de glicose, triglicerídeos e colesterol no sangue 6 HPI. Sabe-se que a análise da glicemia é a forma mais

clássica de controle da eficiência aloxânica na destruição das células β , com evidência permanente e completa da lise celular e redução da massa de células β , conseqüentemente hipoinsulinemia e hiperglicemia (SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008).

A insulina estabelece um importante regulador da homeostase de glicose no organismo, por reduzir a produção hepática de glicose (via diminuição da glicogenólise e gliconeogênese), bem como promove o estoque de glicogênio e aumenta a captação deste monossacarídeo nos tecidos muscular e adiposo, estimulando a lipogênese no fígado, e nos adipócitos reduz a lipólise, inibindo a liberação de ácidos graxos livres (HAVEL, 1996; CARVALHIERA, ZECCHIN, SAAD, 2002; GUYTON e HALL, 2011). No entanto, a deficiência insulínica, como no quadro de diabetes, causa alterações metabólicas severas, como a perda do transporte de glicose para dentro da célula e taxas aumentadas de glicogenólise no fígado, ocorrendo hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (YOXALL e HIRD, 1996; GARG, 1998; O'BRIEN et al., 1998; SIRAJ et al., 2006; LEME et al., 2007). Segundo estudo de Garg (1994), as alterações lipídicas mais comuns em diabéticos são a hipertrigliceridemia. A diminuição da atividade catalítica da enzima lípase lipoprotéica no tecido adiposo é apontada como principal responsável por este aumento de triglicerídeos séricos (SIMSOLO et al., 1992). Sendo citado por Adma, (2001), que o hepatócito é responsável por remoção de triglicerídeos séricos, usando-os como fonte de energia e também para formação de colesterol.

Tilapias aloxano-diabéticas apresentaram aumento de fosfatase alcalina sérica, corroborando os achados de Houssay et al., (1946), que observaram aumento de fosfatase concomitantemente com lesões hepáticas em cães diabéticos por 2 semanas. A presença da fosfatase alcalina elevada no animal diabético é um indicador da disfunção hepática inicial (REGNELL e LERNMARCK, 2011). De acordo com Halliwell (1997) e Datta et al. (1998), a peroxidação lipídica é um passo crucial na patogênese de doenças de radicais livres, acarretando lesão e disfunções hepáticas. Considerando a análise bioquímica da atividade enzimática de fosfatase alcalina indicadora de lesão hepática, enquanto a funcionalidade dos tecidos hepáticos pode ser determinada pela concentração de substâncias sintetizadas no

fígado ou pertencentes a processos metabólicos específicos como o colesterol e os triglicéridos. (SUJA et al., 2004; SHIH et al., 2005).

Em relação às alterações no escore corporal de algumas tilápias aloxano-diabéticas, notou-se severa diminuição da musculatura esquelética, revelando na histopatologia aumento da deposição de tecido adiposo no subcutâneo, entre as miofibras e grande quantidade de tecido fibroso entre as mesmas. Tilápias aloxano-diabéticas e tratadas com dexametasona apresentaram necrose difusa nas miofibras por todo tecido muscular esquelético, caracterizando um quadro de rabdomiólise aguda severa. No diabetes, observa-se alterações no metabolismo proteico em função do hipoinsulinismo acarretando um quadro catabólico. A insulina é um importante regulador da síntese proteica e da proteólise no músculo esquelético. O balanço entre estes dois processos fisiológicos determinam a massa muscular. Alguns estudos têm mostrados um comprometimento da evolução da massa corporal, além de retardo da estrutura e do processo de maturação pela privação de insulina (ROGATTO e LUCIANO, 2001; RIBEIRO et al., 2007).

A diabetes em tilápias diminuiu a infiltração de células inflamatórias e a neovascularização no foco inflamado 6 HPI, corroborando os achados de Pereira et al, (1987) que demonstraram diminuição do infiltrado de neutrófilos na cavidade pleural em ratos diabéticos comparado com animais saudáveis. Em estudos, observou-se que ratos diabéticos induzidos por aloxana possuíam menor migração de neutrófilos e baixos níveis de RNAm para TNF- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-10 quando comparados com animais controle, 6 horas após a instilação de LPS (MARTINS et al., 2006; MARTINS et al., 2009).

Em seres humanos, o diabetes mellitus provoca disfunção imune, baixa secreção de citocinas pro-inflamatórias, aumentando a susceptibilidade às infecções (GEERLINGS e HOEPELMAN, 1999; GEERLINGS et al., 2000). Por outro lado, pacientes diabéticos apresentam concentrações plasmáticas elevadas de IL-6 (FERNÁNDEZ-REAL e RICART, 2003). Existem evidências que a insulina, IL-6 e outras citocinas participam na regulação da função endotelial, visto que quando há uma diminuição de IL-6 e outras citocinas melhora a função endotelial (ALDHAHI e HAMDY, 2003).

No entanto, segundos estudos a insulina controla vários processos celulares por transcrições gênicas (ISH-SHALOM et al., 1997; KEETON et al., 2002; MOUNIER e POSNER, 2006), tais como, a importante ação proliferativa da célula (ISH-SHALOM et al., 1997). Este efeito mitogênico da insulina influencia a resposta vascular frente à reação pró-inflamatória, dessa forma favorecendo o crescimento celular, e a capacidade migratória das células endoteliais, do músculo liso vascular, dos monócitos e mediando a expressão de um fator pró-trombótico e pró-fibrótico (HSUEH e QUIÑONES, 2003; DANDONA et al., 2009). Segundo Dandona et al. (2000), a insulina também apresenta ação vasodilatadora, com relação à produção endotelial de óxido nítrico (NO), estudos demonstraram que a vasodilatação mediada pelo NO está diminuída em pacientes diabéticos (STEHOUWER et al., 1997; DANDONA et al., 2007).

Desta forma, de um modo geral, peixes diabéticos podem apresentar deficiência na resposta inflamatória seis horas após indução inflamatória, particularmente na diapedese de fagócitos através de falhas na capacidade migratória das células endoteliais e da produção diminuída de mediadores químicos pro-inflamatórios, aumentando a susceptibilidade às infecções, fatos que poderiam explicar o aumento do acúmulo de neutrófilo na inflamação em tilápias aloxano-diabéticas 24 HPI em comparação com tilápias normais induzidas aerocistite por *A. hydrophila*. Um aspecto importante para o controle de infecções é a transmigração de células polimorfonucleares (PMN) e eliminação do patógeno no sítio da inflamação (LUSTER et al., 2005). No entanto, em diabéticos ocorre uma disfunção dos PMN e concomitantes alterações nas concentrações de citocinas, podendo influenciar a resposta imunológica do paciente diabético durante uma infecção local ou sistêmica (STEGENGA et al., 2010). Peleg et al., (2007) demonstraram que substâncias microbicidas produzidas por PMN estão reduzidas no diabetes, como exemplo, o superóxido. Estudos também apresentam aumento na adesão dos PMN ao endotélio em pacientes diabéticos (STEGENGA et al., 2010; KOH et al., 2012).

Porém, o aumento exacerbado da resposta a neutrófilos que aderem ao endotélio durante a inflamação podem causar dano às células endoteliais e, então, amplificar a reação inflamatória (LENTSCH e WARD, 2000; VALBUENA e

WALKER, 2006). Motivo este que poderia explicar as severas lesões inflamatórias branquiais em tilápias normais tratadas com insulina 24 HPI. Sendo que os pulmões são particularmente suscetíveis à lesão por neutrófilos (ABBAS e LICHTMAN, 2008). Visto que neutrófilos e monócitos de indivíduos não diabéticos, mas com hiperinsulinemia, apresentam aumento na quimiotaxia, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio após estímulo (WALRAND et al., 2006). A elevada liberação de mediadores pro-inflamatórios pode culminar em uma incontrolável resposta anti-inflamatória compensatória que resultaria na disfunção de órgãos e comprometimento do sistema imune (MOHR et al., 2012; LEWIS et al., 2012). A lesão aguda pulmonar é caracterizada por edema pulmonar e infiltração de células inflamatórias como os neutrófilos que, conseqüentemente, levam a uma redução das trocas gasosas. Na forma severa, o agravamento da hipóxia pode levar à falência múltipla de órgãos (HOTCHKISS e KARL, 2003; FILGUEIRAS et al, 2012). Além disso, existe a hipótese de que macrófagos alveolares possam contribuir para a progressão da inflamação sistêmica decorrente da sepse com comprometimento pulmonar, liberando uma segunda onda de mediadores inflamatórios, que amplificaria essa resposta. (MARTINS et al., 2008a, 2008b; SUNAHARA e MARTINS, 2012).

A identificação de mediadores e dos mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas, metabólicas e celulares, bem como o papel das células endoteliais e das moléculas de interação célula-endotélio são de grande interesse, porque estão envolvidos nas ações deletérias ao próprio organismo (DARVILLE et al., 1993; WANG et al., 1995). Acredita-se que doenças resultantes de lesão endotelial difusa causadas por persistente estímulo inflamatório, são responsáveis pelo comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas (DINARELLO et al., 1993). Contudo, através de diferentes estímulos os leucócitos e células endoteliais liberam mediadores, por exemplo, TNF- α , fator ativador de plaquetas (PAF), IL-1 e IL-6, óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico que são os elementos responsáveis pelos efeitos observados em pacientes com sepse, como febre, coagulação intravascular, depressão miocárdica e hipotensão (BEUTLER, 2002; HOTCHKISS e KARL, 2003).

Neste contexto, tilápias tratadas com insulina durante aerocistite infecciosa apresentaram diminuição da área respiratória lamelar 24 HPI. Sendo provavelmente o motivo para explicar as alterações hepáticas, observada 48 HPI, caracterizada por

degeneração e necrose centrolobular inflamatória. Em vista que lesões pulmonares levam diminuição do nível de oxigênio sanguíneo e conseqüentemente hipóxia tecidual hepática, produzindo atrofia, degenerações e até necrose centrolobulares (RODRIGUES-ROISIN, MICHEL, KRONKA, 2008; MCGAVIN e ZACHARY, 2009). Por outro lado, as degenerações hepáticas por hipóxia podem causar congestão, reduzindo o fluxo sanguíneo e tornando o tecido hepático susceptível à lesão por neutrófilo (RODRIGUES-ROISIN, MICHEL, KRONKA, 2008; ABBAS e LICHTMAN, 2008).

No entanto, o pulmão é frequentemente afetado na sepse podendo desenvolver a síndrome do desconforto respiratório agudo devido alterações patológicas (BHARGAVA e WENDT, 2012; SURATT e PARSONS, 2006). As lesões pulmonares por sepse são caracterizadas por edema pulmonar e infiltração de células inflamatórias como os neutrófilos que, conseqüentemente, levam a uma redução das trocas gasosas e na forma mais severa podem levar a hipóxia e falência múltipla de órgãos (HOTCHKISS e KARL, 2003; FILGUEIRAS et al., 2012).

Entretanto, tilápias diabéticas e/ou normais tratadas com insulina apresentaram diminuição de linfócitos e ausência de trombócitos no local inflamado com evidente linfocitose e trombocitose 48 HPI, sugerindo a hipótese de evolução para uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica, visto que a lesão tecidual em resposta a agressão bacteriana podem culminar em comprometimento do sistema imunológico (HOTCHKISS e KARL, 2003; MUNFORD, 2006; MOHR et al., 2012; LEWIS et al., 2012). Estudos têm descrito que a maciça liberação de mediadores inflamatórios na circulação em resposta a lesão tecidual ao LPS pode resultar na ativação do sistema de coagulação e leucócitos antes que eles deixem a vasculatura, causando alterações na homeostasia (HOTCHKISS e KARL, 2003; ABBAS e LICHTMAN, 2008).

Contudo, desconhecendo a causa que desencadeou a síndrome de resposta inflamatória sistêmica neste estudo, acretida-se na hipótese de que a agressão bacteriana e/ou de seus subprodutos (endotoxinas, LPS), não seriam os únicos responsáveis pelas alterações patológicas encontradas nos pacientes em choque, visto que a resposta de defesa do hospedeiro frente aos diferentes tipos de agressões pode desempenhar papel importante no desenvolvimento de ações

deletérias ao próprio organismo do hospedeiro (DARVILLE et al., 1993; MUNFORD, 2006; BAPTISTE, 2007).

BAMBERGER e GURLEY (1994) demonstraram que pacientes com diagnóstico clínico de choque séptico não apresentavam na realidade diagnóstico positivo para infecção microbiológica. Segundo Goris (1996), a síndrome de resposta inflamatória sistêmica e a sepse são resultantes da ocorrência do estímulo excessivo de mediadores pró-inflamatórios ou da reação à resposta sistêmica inflamatória a uma variedade de estímulos infecciosos e não infecciosos. Salomão et al. (2008) demonstraram que a resposta celular no decorrer da sepse é dinamicamente regulada. Uma resposta diminuída ou aumentada pode ser encontrada dependendo da função, do tipo celular avaliado e o do percurso da sepse, sendo que essa variação parece ser mais dinâmica em neutrófilos.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados deste trabalho permiti extrair as seguintes inferências:

- Tilápias do Nilo com indução de aerocistite aguda por *Aeromonas hydrophila* apresentaram predomínio de neutrófilos no foco inflamatório, descrevendo um padrão fibrinossupurativo no estudo histopatológico.
- O tratamento com insulina em tilápias do Nilo favoreceu o acúmulo celular inflamatório na aerocistite aguda.
- O tratamento com dexametasona retardou a resposta celular na reação inflamatória, suprimindo a resposta imune inata.
- A dose de 100mg de aloxano por quilograma de peso vivo tornou as tilápias do Nilo aloxano-diabéticas.
- As administrações de aloxano e/ou dexametasona alteraram o metabolismo energético de tilápias do Nilo, aumentando principalmente os níveis de glicose e triglicerídeos no sangue.
- Tilápias diabéticas, de um modo geral, apresentaram comprometimento no controle do sistema imune inato, particularmente na migração de fagócitos, assim evoluindo para uma intensa resposta sistêmica com múltiplas anormalidades fisiológicas e imunológicas em diferentes tecidos, tais como: renal (porção cranial), branquial, hepático e esplênico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; POBER, J. S.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2008. 580 p.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, New York, v. 2, p. 675-680, 2001.
- ALDHAHI, W.; HAMDY, O. Adipokines, inflammation, and endothelium in diabetes. **Curr. Diab. Rep.**, Philadelphia, v. 3, n. 4, p. 293-298, 2003.
- ALEXANDRINO, A. C.; OKUMURO, M. P. M.; BALDASSI, L.; ARAUJO, A. P.; KURODO, C. K.; ARAUJOC, K.; WALKASA, Y. S. Ocorrência de *Aeromonashydrophila* em truta arco-irís (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intense-relato de caso. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 111-117, 2000.
- AMERICAN DIABETES MELLITUS ASSOCIATION (ADMA). Management of dislipidemia in adults with Diabetes mellitus . **Diabetes mellitus Care** 2001; 24:S58-61.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. 3rd ed. Chichester: Springer Praxis, 1999. 459 p.
- BAMBERGER DM, GURLEY MB. Microbial Etiology and Clinical Characteristics of Distributive Shock. **Clinic. Infec. Disea.** 1994; 18: 726-30.
- BAPTISTE, E. J. Cellular mechanism in sepsis. **J. Intensive Care Med.**, Thousand Oaks, v. 22, n. 2, p. 63-72, 2007.
- BARTON, B.; IWAMA, G. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annu. Rev. Fish Dis.**, Amsterdam, v. 1, p.3-26, 1991.
- BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M.; MORAES, J. E. R. 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.**, London, v. 133, n. 2-3, p. 146-54, 2005.
- BELO, M. A. A.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; CARDOSO, F.; MARINELLI, L. A.; GAGLIARDI, P. C.; MOTA, F. C. D.; PILARSKI, F. Somatic response of tilapia treated with exogenous corticosteroid during acute inflammatory process induced by *Aeromonashydrophila*. **World Aquaculture Society**, Natal, Brasil, 2011. Disponível em: <[tps://www.was.org/WasMeetings/meetings/mobile/MG_Paprr.aspx?i=24808](https://www.was.org/WasMeetings/meetings/mobile/MG_Paprr.aspx?i=24808)>.

BHARGAVA, M.; WENDT, C. H. Biomarkers in acute lung injury. **Transl. Res.**, New York, v. 159, n. 4, p. 205-217, 2012.

BLEUTER, B. Toll-like receptors: how they work and what they do. **Curr. Opin. Hematol.**, Philadelphia, v. 9, p. 2-10, 2002.

BOOTH, N.; McDONALD, L. E. Drogas analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 22, p. 361-375.

BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama: Birmingham Publishing, 1990. 482 p

BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; PEREIRA, G. T.; TAVARES DIAS, M.; ONAKA, E. M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractusmesopotamicus*, HOLMBERG, 1887.(characidae). **J. World Aquac. Soc.**, Hoboken, v. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.

BRIERRE, S.; KUMARI, R.; DEBOISBLANC, B. P. The endocrine system during sepsis. **Am. J. Med. Sci.**, Philadelphia, v. 328, n. 4, p. 232-247, 2004.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.

BUCHANAN, R. L.; PALUMBO, S. A. *Aeromonashydrophila* e *Aeromonassobria* as potential food poisoning species: a review. **J. Food Saf.**, Hoboken, v. 7, n. 1, p. 15–29, 1985.

CALDWELL, R. B.; FITZGERALD, M. E. The choriocapillaris in spontaneously diabetic rats. **Microvasc. Res.**, Maryland Heights, v. 42, n. 3, p. 229-244, 1991.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as stress response mitigator of matrixã *Bryconcephalus* during transport. **Aquac. Res.**, Chichester, v. 32, n. 4, p. 297-304, 2001.

CARUSO, M. A.; SHERIDAN, M. A. New insights into the signaling system and function of insulin in fish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 173, n. 3, p. 227–247, 2011.

CARUSO, M. A.; KITTLSON, J. D.; RAINE, J.; SHERIDAN, M. A. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess two insulin-encoding mRNAs that are differentially expressed. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 155, n. 3, p. 695-704, 2008.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302002000400013>>.

CHAN, S. J.; STEINER, D. F. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. **Am. Zool.**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 213-222, 2000.

CIPRIANO, R. ***Aeromonashydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish**. Washington: Fish and Wildlife Service. Division of Fishery Research, 2001. (Fish Diseases of Leaflet, 68).

CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; MANRIQUE, W. G.; CASTRO, M. P.; LOUREIRO, B. A.; MARCUSSO, P. F.; BELO, M. A. A.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Acute aerocystitis in *Piaractus mesopotamicus*: Participation of eicosanoids and pro-inflammatory cytokines **Fish Shellfish Immunol.**, London, v. 34, n. 5, p. 1057-1062, 2013.

COHEN, J. The immuno pathogenesis of sepsis. **Nature**, London, v. 420, n. 19, p. 885 -891, 2002.

COSTA ROSA, L. F.; SAFI, D. A.; CURY, Y.; CURI, R. The effect of insulin on macrophage metabolism end function. **Cell. Biochem. Funct.**, Bognor Regis, v. 14, n. 1, p. 33-42, 1996.

DANDONA, A. A. P. Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase. **Metabolism**, Maryland Heights, v. 49, n. 2, p. 147-150, 2000.

DANDONA, P.; CHAUDHURI, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, San Diego, v. 99, n. 4A, p. 16B-26B, 2007.

DANDONA, P.; CHAUDHURI, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P. Insulin as an anti-inflammatory and antiatherogenic modulator. **J. Am. Coll. Cardiol.**, San Diego, v. 53, suppl. 5, p. S14-S20, 2009.

DARVILLE, T.; GIROIR, B.; JACOBS, R. The Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS): immunology and potential immunotherapy. **Infection**, Heidelberg, v. 21, n. 5, p. 279-89, 1993.

DATTA, S.; BASU, K.; SINHA, S.; BHATTACHARYYA, P. Hepatoprotective effect of a protein isolated from *Cajanusindicus* (Spreng) on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Indian J. Exp. Biol.**, New Delhi, v. 36, n. 2, p. 175-181, 1998.

DINARELLO, C. A.; GELFAND, J. A.; WOLFF, S. M. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. **JAMA**, Chicago, v. 269, n. 14, p. 1829-1835, 1993.

DOOLEY, J. S. H.; TRUST, T. J. Surface protein composition of *Aeromonashydrophila* virulent for fish: identification of an S-Layer protein. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, n. 2, p. 499-506, 1988.

DYER, A. R.; UPTON, Z.; STONE, D.; THOMAS, P. M.; SOOLE, K. L.; HIGGS, N.; QUINN, K.; CARRAGHER, J. F. Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulinlike growth factor I (IGF-I) and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 135, n. 3, p. 268–275, 2004.

ENDO, M.; ARUNLERTAE, C.; RUANGPAN, L. A new method for collection neutrophils using swim bladder. **Fish. Sci.**, Tokyo, v. 63, n. 4, p. 644-645, 1997.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M.; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 24, n. 3, p. 278-301, 2003.

FILGUEIRAS Jr., L. R.; MARTINS, J. O.; SEREZANI, C. H.; CAPELOZZI, V. L.; MONTES, M. B. A.; JANCAR, S. Sepsis-induced acute lung injury (ALI) is milder in diabetic rats and correlates with impaired NF κ B activation. **Plos One**, v. 7, p. 1-9, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044987>>.

FINN, J. P. The protective mechanisms in diseases of fish. **Vet. Bull.**, Farnham Royal, v. 40, n. 12, p. 873-886, 1970.

FREUNDENBERG, M. A. The fate of lipopolisaccharides in rats: evidence for chemical alteration in the molecule. **Rev. Infect. Dis.**, Louvain, v. 6, p. 483-487, 1984.

FUJIMORIA, C.; OGIWARAA, K.; HAGIWARAA, A.; RAJAPAKSEB, S.; KIMURAA, A.; TAKAHASHIA, T. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryziaslatipes*: possible involvement in ovulation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, Shannon, v. 332, n. 1-2, p. 67–77, 2011.

GARCIA LEME, J. Regulatory mechanisms in inflammation: new aspects of autopharmacology. **Gen. Pharmacol.**, Oxford, v.12, p. 15-20, 1982.

GARCIA LEME, J. **Hormones and inflammation**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 238.

GARCIA LEME, J.; HAMARURA, L.; MIGLIORI, R. H.; LEITE, M. P. Influence of diabetes upon the inflammatory response of the rat: a pharmacological analysis. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p.74-81, 1973.

GARG, A. Management of dislipidemia in IDDM patients. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 17, n. 3, p. 224-234, 1994.

GARG, A. Dylipoproteinemia and diabetes mellitus. **Endocrinol. Metabol. Clin. North Am.**, Maryland Heights, v. 27, p. 613-645, 1998.

GEERLINGS, S. E.; HOEPELMAN, A. I. M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Oxford, v. 26, p. 259-265, 1999.

GEERLINGS, S. E.; BROUWER, E. C.; VAN KESSEL, K. C.; GAASTRA, W.; STOLK, R. P.; HOEPELMAN, A. L. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Invest.**, Chichester, v. 30, p. 995-1001, 2000.

GILMAN, A. G. **The pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 355 p.

GORIS, R. J. A. MODS/SIRS: Result of an Overwhelming Inflammatory Response? **Worl. J. Surg.** 1996; 20: 418-21.

GRIFFIN, P. J.; SNIEZSKO, S. F.; FRIDDLE, S. B. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 129-138, 1953.

GROVER, A.; PADGINTON, C.; WILSON, M. F. Insulin attenuates norepinephrine-induced venoconstriction. An ultrasonographic study. **Hypertension**, New York, v. 25, n. 4, pt. 2, p. 779-784, 1995.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2011.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. **Nutr. Rev.**, Washington, v. 55, suppl., p. S44–S49, 1997.

HAVEL, P. J. Relationship of plasma insulin and adiposity in normal weight and over-weight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 81, n. 12, p. 4406-4413, 1996.

HAVELAAR, A. H.; VONK, M. The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 7, p. 169-171, 1988.

HERNANDEZ-SANCHEZ, C.; MANSILLA, A.; DE LA ROSA, E. J.; DE PABLO, F. Proinsulinin development: new roles for an ancient prohormone. **Diabetologia**, Heidelberg, v. 49, n. 6, p. 1142-1150, 2006.

HIGUERA, M. de la; CARDENAS, P. Hormonal effects on gluconeogenesis from (u-14c)glutamate in rainbow trout (*salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol.**: part B biochem. mol. biol., Bethesda, v. 85B, n. 3, p. 517-521, 1986.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **New Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, p. 138-150, 2003.

HOUSSAY, B. A.; BRIGNONE, R. F.; MAZOCCO, P. Alloxan and diabetes. **Rev. Soc. Argent. Biol.**, Buenos Aires, v. 22, p. 195-231, 1946.

HRYTSENKO, O.; WRIGHT, J. R.; MORRISON, C. M.; POHAJDAK, B. Insulin expression in the brain and pituitary cells of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brain Res.**, Amsterdam, v. 1135, n. 1, p. 31-40, 2007.

HSUEH, W. A.; QUIÑONES, M. J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. **Am. J. Card.**, Bridgewater, v. 92, n. 4A, p. 10J-17J, 2003.

INCE, B. W.; THORPE, A. The effects of diabetogenic and hypoglycaemic agents in the northern pike, *Esox lucius* L. **Gen. Pharmacol.**, Philadelphia, v. 6, n. 2-3, p. 109-113, 1975.

INCE, B. W.; THORPE, A. Plasma insulin and glucose responses to glucagon and catecholamines in the European silver eel (*Anguilla Anguilla* L.). **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 33, n. 4, p. 453-459, 1997.

ISH-SHALOM, D.; CHRISTOFFERSEN, C. T.; VORWERK, P.; SACERDOTI-SIERRA, N.; SHYMKO, R. M.; NAOR, D.; De MEYTS, P. Mitogenic properties of insulin analogues mediated by the insulin receptor. **Diabetologia**, Heidelberg, v. 40, suppl. 2, p. S25-S31, 1997.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, diseases presentations, and unanswered questions. **Clin. Infect. Dis.**, Cary, v. 27, n. 2, p. 332-344, 1998.

JANSSON Jr., C. W.; WAALER, E. Body temperature, antibody formation and inflammatory response. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, Carroll, v. 69, p. 577-566, 1967.

JÖRNS, A.; MUNDAY, R.; TIEDGE, M.; LENZEN, S. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets *in vitro*. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 155, n. 2, p. 283–293, 1997.

KAJIMURA, S.; HIRANO, T.; VISITACION, N.; MORIYAMA, S.; AIDA, K.; GRAU, E. G. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGF binding proteins in the tilapia, *Oreochromismossambicus*. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 178, n. 1, p. 91-99, 2003.

KATZENBACK, B. A.; BELOSEVIC, M. Molecular and functional characterization of *kita* and *kita* of the goldfish (*Carassius auratus*L.). **Dev. Comp. Immunol.**, Kidlington, v. 33, n. 11, p.1165-1175, 2009.

KEETON, A. B.; AMSLER, M. O.; VENABLE, D. Y.; MESSINA, J. L. Insulin signal transduction pathways and insulin-induced gene expression. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 227, n. 50, p. 48565-48573, 2002.

KHANNA, S. S.; REKHARI, K. Changes in the blood glucose and histology of the pancreatic islets of *Heteropneustes fossilis* (Bl.) after treatment with alloxan. **Acta Anat.**, Basel, v. 82, n. 4, p. 619–632, 1972.

KIM, H. J.; YASUIKE, M.; KONDO, H.; HIRONO, I.; AOKI, T. Molecular characterization and gene expression of a CXC chemokine gene from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Fish Shellfish Immunol.**, London, v. 23, n. 6, p. 1275-1284, 2007.

KIROV, S. M.; TASSELL, B. C.; SEMMLER, A. B. T.; O'DONOVAN, L. A.; RABAAN, A. A.; SHAW, J. G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 184, n. 21, p. 547-555, 2002.

KOH, G. C.; PEACOCK, S. J.; POLL, T. van der; WIERSINGA, W. J. The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Heidelberg, v. 31, n. 4, p. 379-388, 2012.

LEES, P.; LANDONI, M. F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P. I. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, Chichester, v. 27, n. 6, p. 479-490, 2004.

LEME, J. A. C. A.; GOMES, R. J.; MELLO, M. A.; LUCIANO, E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Factors**, Chur, v. 25, n. 1, p. 9-14, 2007.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, Heidelberg, v. 51, n. 12, p. 216-226, 2008.

LEWIS, D. H.; CHAN, D. L.; PINHEIRO, D.; CHAN-ARMITAGE, E.; GARDEN, O. A. The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory t cells. **J. Vet. Intern. Med.**, Hoboken, v. 26, p. 457-482, 2012.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nat. Immunol.**, New York, v. 6, n. 12, p. 1182-1190, 2005.

MAJEED, K. N.; EGAN, A. F.; Mac RAE, I. C. Production of exotoxins by *Aeromonas* spp at 5°C. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 69, n. 3, p. 332-337, 1990.

MARTINS, J. O. **Papel da insulina na produção e liberação de citocinas na vigência da inflamação induzida por lipopolissacarídeo e na inflamação alérgica pulmonar em ratos.** 2006. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S. Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. **Cell. Physiol. Biochem.**, Basel, v. 21, n. 4, p. 297-304, 2008a.

MARTINS, J. O.; FERRACINI, M.; RAVANELLI, N.; LANDGRAF, R. G.; JANCAR, S. Insulin suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression and NF- κ B activation in alveolar macrophages. **Cell. Physiol. Biochem.**, Basel, v. 22, n. 1-4, p. 279-286, 2008b.

MARTINS J. O.; ZANONI, F. L.; MARTINS, D. O.; COIMBRA, R.; KRIEGER, J. E.; JANCAR, S.; SANNOMIYA, P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through Nuclear Factor- κ B activation in LPS-induced acute lung injury in rats. **Shock**, Farsta, v. 31, n. 4, p. 404-409, 2009.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E. Carragenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 31-39, 2006.

MATHISON J. C.; TOBIAS, P. S.; WOLFSON, E.; ULEVITCH, R. J. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophages recognition of Gram-negative bacteria. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 149, n. 1, p. 200-206, 1992.

MATUSHIMA, E. R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Braz. J. Vet. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Trans. Am. Fish. Soc.**, Bethesda, v. 106, n. 3, p. 201-212, 1977.

MCCORMICK, N. A.; NOBLE, E. C. The yield of insulin from fish. **Contrib. Can. Biol. New Ser.**, v. 2, p. 117-127, 1924.

McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476 p.

McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, p. 1088-1090.

McLEAY, D. J. Effects of cortisol and dexamethasone on the pituitary- interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 21, n. 3, p. 441-450, 1973.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHEL, S.; TOMAS, J. M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 157-168, 1995.

METCHNIKOFF, O. **Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891**. London: Kegan, 1893. p. 218.

METCHNIKOFF, O. **Immunity in infective diseases**. Cambridge: Cambridge University Press, 1905. p. 591.

MILGRAM, S. L.; MCDONALD, J. K.; NOE, B. D. Neuronal influence on hormone release from anglerfish islet cells. **Am. J. Physiol.**, Baltimore, v. 261, n. 4, part 1, p. E444-E456, 1991.

MOHR, A.; POLZ, J.; MARTIN, E. M.; GRIEBEL, S.; KAMMLER, A.; PÖTSCHKE, C.; LECHNER, A.; BRÖKER, B. M.; MOSTBÖCK, S.; MÄNNEL, D. N. Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 42, n. 2, p. 341-352, 2012.

MOMMSEN, T. P.; PLISETSKAYA, E. M. Insulin in fishes and Agnathans-history, structure, and metabolic-regulation. **Rev. Aquat. Sci.**, Boca Raton, v. 4, p. 225-259, 1991.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol. Fish.**, Dordrecht, v. 9, p. 211-268, 1999.

MONTERO, D.; MARRERO, M.; IZQUIERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.; TORT, L. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 171, n. 3-4, p. 269-278, 1999.

MORAES, F. R.; GARCIA LEME, J. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. **Microvasc. Res.**, Maryland Heights, v. 23, p. 281-283, 1982.

MORAES, F. R.; BECHARA, G. H.; MORAES, J. R. E. Effect of alloxan diabetes and adrenalectomy on carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 1, p. 47-53, 1987.

MORAES, A. C.; BELO, M. A. A.; PRADO, E. J. R.; MARINELLI, L.; GAGLIARD, P. C.; CARDOSO, F. Glucocorticoid activity of dexamethasone on cellular response in inflammatory exudate of tilapia, vaccinated and challenged with *Aeromonas hydrophila*. 2011. **Rev. Ciênc. Agrovet.**, n. 815, 2011 Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/indiceautor.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

MORRISON, C. M.; FITZSIMMONS, K.; WRIGHT JR., J. R. **Atlas of tilapia histology**. World Aquaculture Society, 2007. 96 p.

MOUNIER, C.; POSNER, B. I. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 84, p. 713-724, 2006.

MUNFORD, R. S. Severe sepsis and septic shock: The role of gram-negative bacteremia. **Annu. Rev. Pathol: Mech. Dis.**, Palo Alto, v. 1, p. 467-496, 2006.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poult.Sci.**, Savoy, v. 31, n. 4, p. 735-738, 1952.

NGUYEN, H.; LIM, J.; DRESNER, M., L.; NIXON, B. Effect of local corticosteroids on early inflammatory function in surgical wound of rats. **J. Foot Ankle Surg.**, Maryland Heights, v. 37, n. 4, p. 313-318, 1998.

NOGA, E. J. The importance of *Lernaeacrucita* (leSeuer) in the initiation of skin lesions in large mouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede) in the Chowan River, North Carolina. **J. Fish Dis.**, Chichester, v. 9, p. 295-302, 1986.

O'BRIEN, T.; NGUYEN, T. T.; ZIMMERMAN, B. R. Hyperlipidemia and diabetes mellitus. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v. 73, n. 10, p. 129-133, 1998.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune system. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v. 79, n. 3-4, p. 167-180, 2001.

PELEG, A. Y.; WEERARATHNA, T.; McCARTHY, J. S.; DAVIS, T. M. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes/Metab. Res. Rev.**, Bognor Regis, v. 23, p. 3-13, 2007.

PEREIRA, M. A. A.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes**, Alexandria, v. 36, n. 11, p. 1307-1314, 1987.

PETTITT, T. R.; ROWLEY, A. F. Fatty acid composition and lipoxygenase metabolism in blood cells of the lesser spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula*. **Comp. Biochem. Physiol. B: biochem. mol. biol.**, Bethesda, v. 99B, n. 3, p. 647-652, 1991.

PICKERING, A. D. Cortisol induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta*. **Freshw. Biol.**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 47-56, 1984.

PICKERING, A. D. **Stress and fish**. London: Academic Press, 1981. p. 367.

PLISETSKAYA, E. M.; MOMMSEN, T. P. Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. **Int. Rev. Cytol.**, Maryland Heights, v. 168, p. 187-257, 1996.

PLISETSKAYA, E. M.; SHERIDAN, M. A.; MOMMSEN, T. P. Metabolic changes in coho and chinook salmon resulting from acute insufficiency in pancreatic hormones. **J. Exp. Zool.**, Hoboken, v. 249, n. 2, p. 158-164, 1989.

POPOFF, M. III Genus *Aeromonas* Kluver e van Niel, 1936. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's: manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 545-548.

PUGLIESE, G.; TILTON, R. G.; SPEEDY, A.; CHANG, K.; SANTARELLI, E.; PROVINCE, M. A. Effects of very mild versus overt diabetes on vascular haemodynamics and barrier function in rats. **Diabetologia**, Heidelberg, v. 32, n. 12, p. 845-857, 1989.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 311 p.

REGNELL, S. E.; LERNMARK, A. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. **Rev. Diabetic Stud.**, Duisburg, v. 8, n. 4, p. 454-467, 2011.

REQUE, V. R.; MORAES, J. R. E.; BELO, M. A. A.; MORAES, F. R. Inflammation induced by *Aeromonashydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 300, p. 37-42, 2010.

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELLO, M. A. R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizado em ratos. **Motriz Rev. Educ. Fís.**, Rio Claro, v. 13, n. 1, p. 72-77, 2007.

ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R.; TRANT, J. M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and disease outbreak. **Progress. Fish Culturist**, Philadelphia, v. 49, p. 1-12, 1987.

ROBERTSON, H.; HANE, S.; WEXLER, B. C. The effect of hydrocortisone on immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 3, p. 422-436, 1963.

RODRIGUES, A. C.; SCHELLINI, S. A.; GREGORIO, E. A.; SPADELLA, C. T.; PADOVANI, C. R. Choroidal vasculature in diabetic rats. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Siena, v. 36, n. 3-4, p. 327-331, 2004.

RODRIGUES-ROISIN, R.; MICHAEL, J.; KROWKA, M. D. Hepatopulmonary Syndrome — a liver induced lung vascular disorder. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 358, p. 2378-2387, 2008.

ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Influência do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de proteínas. **Motriz Rev. Educ. Fís.**, Rio Claro, v. 7, n. 2, p. 75-82, 2001.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Londres: Mosby, 2003. 481 p.

ROY, S. S.; MUKHERJEE, M.; BHATTACHARYA, S.; MANDAL, C. N.; KUMAR, L. R.; DASGUPTA, S. I.; BANDYOPADHYAY, K.; WAKABAYASHI, A. New cell secreting insulin. **Endocrinology**, Baltimore, v. 144, n. 4, p. 1585–1593, 2003.

SAAD, S. M. I.; IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P. Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-27, 1995.

SALOMÃO, R.; MARTINS, P. S.; BRUNIALTI, M. K.; FERNANDES, M. L.; MARTOS, L. S.; MENDES, M. E.; GOMES, N. E.; RIGATO, O. TLR signaling pathway in patients with sepsis. **Shock**, Farsta, v. 30, p. 73-79, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1.

SARDER, M. R.; THOMPSON, K. D.; PENMAN, D. J.; MCANDREW, B. J. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*L.) clones: I. non-specific responses. **Dev. Comp. Immunol.**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 37–46, 2001.

SECOMBES, C. J.; WANG, T.; HONG, S.; PEDDIE, S.; CRAMPE, M.; LAING, K. J.; CUNNINGHAM, C.; ZOU, J. Cytokines and innate immunity in fish. **Dev. Comp. Immunol.**, Kidlington, v. 25, p. 713–723, 2001

SHIH, C. C.; WU, Y. W.; LIN, W. C. Aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* attenuate hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **Phytomedicine**, Jena, v. 12, p. 453-460, 2005.

SILVA, J. R. M. C.; VELLUTINI, B. C.; PORTO NETO, L. R.; PRESSINOTTI, L. N.; RAMOS, M. C.; COOPER, E. L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; JENSCH-JUNIOR B. E.; SHIMADA, J. C. Resposta imune inespecifica de animais ectotérmicos antárticos sob temperaturas polares. **Oecol. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 110-121, 2007.

SIMSOLO, R. B.; ONG, J. M.; SAFFARI, B.; KERN, P. A. Effect of improved diabetes control on the expression of lipoprotein lipase in human adipose tissue. **J. Lipid Res.**, Memphis, v. 33, p. 89-95, 1992.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: FUNEP-, 1995. 70 p.

SIRAJ, E. S.; SEYOUM, B.; SAENZ, C.; ABDULKADIR, J. Lipid and lipoprotein profiles in Ethiopian patients with diabetes mellitus. **Metab.: clin. exper.**, New York, v. 55, n. 6, p. 706-710, 2006.

SIT, D.; KADIROGLU, A. K.; YILMAZ, M. E. The prevalence of insulin resistance and its relationship between anemia, secondary hyperparathyroidism, inflammation, and cardiac parameters in chronic hemodialysis patients. **Ren Fail**, New York, v. 27, n. 4, p. 403-407, 2005.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University Press, 1974. 503 p.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **System for Microsoft Windows**: release 8.2. Cary: 2001. 1 CD-ROM.

STEHOUWER, C.D. A.; LAMBERT, J.; DONKER, A. J.; HINSBERGH, V. W. van. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. **Cardiovasc. Res.**, Oxford, v. 34, p. 55-68, 1997.

STEGENGA, M. E.; VINCENT, J. L.; VAIL, G. M.; XIE, J.; HANEY, D. J.; WILLIAMS, M. D.; BERNARD, G. R.; POLL, T. van der. Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis. **Crit. Care Med.**, Baltimore, v. 38, n. 2, p.539-545, 2010.

STEINBERG, H. O.; BRECHTEL, G.; JOHNSON, A. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 94, n. 3, p. 1172-1179, 1994.

SUJA, S. R.; LATHA, P. G.; PUSHPANGADAN, P.; RAJASEKHARAN, S. Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachyszeylanica* (L.) Hook against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v. 92, p. 61-66, 2004.

SUNAHARA, K. K.; MARTINS, J. O. Alveolar macrophages in diabetes: friends or foes? **J. Leukoc. Biol.**, Bethesda, v. 91, n. 6, p. 871-876, 2012.

SURATT, B. T.; PARSONS, P. E. Mechanisms of acute lung/injury acute respiratory distress syndrome. **Clin. Chest. Med.**, Maryland Heights, v. 27, p. 579-589, 2006.

SUZUKI, Y.; HIBIYA, T. Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. **Fish Pathol.**, Tokyo, v. 23, n. 3, p. 179-184, 1988.

SWAIN P.; NAYAK, S. K.; NANDA P. K.; DASH, S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review . **Fish Shellfish Immunol.**, London, v. 25, n. 3, p. 191-201, 2008.

SZKUDELSKI, T. The mechanisms of alloxan and streptozotocin action in B cell of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, Prague, v. 50, n. 6, p. 536–546, 2001.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 21, p. 335-376, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da TilapiarendalliBoulenger, 1896 (*Osteichthyes: cichlidae*) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Biosci. J.**, Uberlandia, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2003.

TAYLOR, J. S.; BRAASCH, I.; FRICKEY, T.; MEYER, A.; VAN DE PEER, Y. Genome uplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. **Genome Res.**, Woodbury, v. 13, n. 3, p. 382–390, 2003.

TENIUS, F. P.; BIONDO-SIMÕES, M. L.; MULOSHII, O. S. Efeito do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, p. 141-149, 2007.

THOMSON, M.; AL-HASSAN, M. J.; FAYAD, J. A. L.; ALI, M. Prostanoid synthesis in whole blood cells from fish of the Arabian Gulf. **Comp. Biochem. Physiol.**, Philadelphia, v. 119, n. 4, p. 639–646, 1998.

THORNDYKE, M. C.; PURVIS, D.; PLISETSKAYA, E. M. Insulin-like immunoreactivity in the brain of two hagfishes, *Eptatretus stouti* and *Myxine glutinosa*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 76, p. 371–381, 1989.

TONSHOFF, B.; KIEPE, D.; CIARMATORI, S. Growth hormone/insulin-like growth factor system in children with chronic renal failure. **Pediatr. Nephrol.**, Heidelberg, v. 20, n. 3, p. 279-289, 2005.

TROVATI, M.; ANFOSSI, G.; MASSUCCO, P. Insulin stimulates nitric oxide synthesis in human platelets and, through nitric oxide, increases platelet concentrations of both guanosine-3',5'-cyclic monophosphate and adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. **Diabetes**, Alexandria, v. 46, p. 742-749, 1997.

TSUJIMOTO, H.; ONO, S.; EFRON, P. A.; SCUMPIA, P. O.; MOLDAWER, L. L.; MOCHIZUKI, H. Role of toll-like receptors in the development of sepsis. **Shock**, Farsta, v. 29, n. 3, p. 315-321, 2008.

TYRBERG, B.; ANDERSSON, A.; BORG, L. Species differences in susceptibility of transplanted and cultured pancreatic islets to the beta-cell toxin alloxan. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 122, n. 3, p. 238–251, 2001.

VALBUENA, G.; WALKER, D. H. Endothelium as a target of infections. **Annu Rev Pathol. Mech. Dis.**, Palo Alto, v. 1, p. 171-198, 2006.

VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. The stress-response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. **Can. J. Zool.**, Ottawa, v. 72, n. 3, p. 379–386, 1994.

WALRAND, S.; GUILLET, C.; BOIRIE, Y.; VASSON, M. P. Insulin differentially regulates monocyte and polymorphonuclear neutrophil functions in healthy young and elderly humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 91, n. 7, p. 2738-2748, 2006.

WANG, X. D.; ANDERSSON, R. The role of endothelial cells in the systemic inflammatory response syndrome and multiple system organ failure. **Eur. J. Surg.**, Estocolmo, v. 161, n. 10, p. 703-713, 1995.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fisher. Res. Board Can.**, Ottawa, v. 27, n. 5, 1970. Disponível em: <<http://dx.doi.org/909-914>, 10.1139/f70-097>.

WEIBEL, E. R.; STAUBLI, W.; GNAGI, H. R.; HESS, F. A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. **J. Cell Biol.**, New York, v. 42, n. 1, p. 68-91, 1969.

WEINREB, E. L. Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. I. Hematology: Under normal and experimental conditions of inflammation. **Zoologica**, New York, v. 43, p. 145-154, 1958.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WILKINSON, T. N.; SPEED, T. P.; TREGGAR, G. W.; BATHGATE, R. A. Evolution of the relaxin-like peptide family. **BMC Evol. Biol.**, London, v. 5, n. 14, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-5-14>>.

WRIGHT, S. D.; RAMOS, R. A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding proteins. **Science**, Washington, v. 249, n. 4975, p. 1431-1433, 1990.

XU, B.; MORRISON, C. M.; YANG, H.; WRIGHT JR, J. R. Tilapia islet grafts are highly alloxan-resistant. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 137, n. 2, p. 132-140, 2004.

YOXALL, A. T.; HIRD, J. F. R. **Bases fisiológicas da medicina do pequeno animal**. São Paulo: Andrei, 1996. p. 13-15.

ZANONI, I.; OSTUNI, R.; MAREK, L. R.; BARRESI, S.; BARBALAT, R.; BARTON, G. M.; GRANUCCI, F.; KAGAN, J. C. CD14 control the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. **Cell**, Cambridge, v. 147, n. 4, p. 868-880, 2011.