

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

ERITROPOIETINA E DEXAMETASONA EM *Danio rerio*
DURANTE AEROCISTITE INDUZIDA POR *Aeromonas*
hydrophila

Patrícia Canossa Gagliardi

Médica Veterinária

2017

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

ERITROPOIETINA E DEXAMETASONA EM *Danio rerio*
DURANTE AEROCISTITE INDUZIDA POR *Aeromonas*
hydrophila

Patrícia Canossa Gagliardi

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, área: Patologia Animal

2017

G135e Gagliardi, Patrícia Canossa
Eritropoietina e dexametasona em danio rerio durante aerocistite
induzida por aeromonas hydrophila / Patrícia Canossa Gagliardi. – –
Jaboticabal, 2017
x, 44 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Marco Antonio de Andrade Belo
Banca examinadora: Annelise Carla Camplesi, Wilson Manrique
Gomez
Bibliografia

1. Eritropoiese. 2. *Danio rerio*. 3. Inflamação. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-02:639.31

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

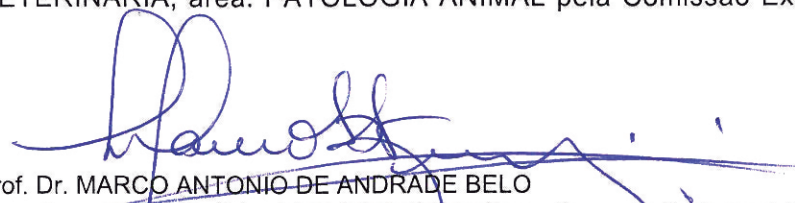
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ERITROPOIETINA E DEXAMETASONA EM *Danio rerio* DURANTE
AEROCISTITE INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila*

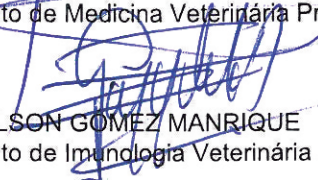
AUTORA: PATRÍCIA CANOSSA GAGLIARDI

ORIENTADOR: MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. WILSON GÓMEZ MANRIQUE
Departamento de Imunologia Veterinária / Universidade Brasil - Descalvado/SP



Profa. Dra. ANNELESE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de abril de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PATRÍCIA CANOSSA GAGLIARDI – Natural de Santo André – SP, nascido em 14 de dezembro de 1988, Médica Veterinária. Ingressou em 2008 no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO, campus Descalvado (SP), concluído a graduação no ano de 2012. No período de graduação exerceu atividades de pesquisa junto ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal da UNICASTELO, obtendo bolsa de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (2010 - 2011), na área de *“fisiopatologia da reação inflamatória em peixes teleósteos”*. Atualmente mestrando pelo departamento de Patologia Animal da UNESP/Jaboticabal-SP, bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ e integrante do Group of Animal Pharmacology (GAP).

**Só há duas maneiras
de viver a vida: a
primeira é vivê-la
como se os milagres
não existissem. A
segunda é vivê-la
como se tudo fosse
milagre.**

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho...

Aos meus pais e irmã, que mesmo diante de todas dificuldades e obstáculos surgidos durante sua realização, estiveram sempre de braços abertos e oferecendo tudo o que estava ao alcance para me dar forças e continuar em frente. Por isso, ofereço este trabalho inteiramente a vocês, Edna minha amada mãe, Luis meu amado pai, e Ellen, minha irmã de sangue e alma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por me permitir relizar esse grande projeto que se chama vida.

Agradeço ao meu orientador, Marco Antônio de Andrade Belo, pelo companheirismo e compreensão, fornecendo-me todo apoio necessário e possível diante das adversidades surgidas ao longo desse período. A ti, minha mais sincera gratidão.

Agradeço o apoio do grupo, da Alessandra, Johnny, Vanessa, Simone, Melque, Wilson e Charlie, em me auxiliarem de forma fundamental na realização deste trabalho.

Agradeço também aos meus amigos, que mesmo sem ajuda direta em relação ao trabalho, me ajudaram fornecendo um pouco de seu tempo para me ouvirem e aconselharem conforme meus erros e acertos.

Agradeço o apoio recebido pelo CNPq durante a realização desse trabalho.

Gratidão a todos citados e envolvidos!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1 Hematologia em zebrafish	2
3.2 Eritropoietina	3
3.3 <i>Aeromonas hydrophila</i>	3
3.4 Anti-inflamatório esteroide	4
4. MATERIAL E MÉTODOS	5
4.1 Peixes e acondicionamento	5
4.2 Delineamento experimental	6
4.3 Anestesia dos animais	6
4.4 Isolamento da bactéria do gênero <i>Aeromonas hydrophila</i>	7
4.5 Preparação do inóculo bacteriano e indução do processo inflamatório	7
4.6 Administração de dexametasona (DEX) e eritropoietina (EPO)	8
4.7 Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória	8
4.8 Avaliação do eritrograma, reticulócitos e contagem total e leucograma	9
4.9 Análises estatística	10
5. RESULTADOS	10
5.1 Avaliação de parâmetros eritrocitários	10
5.2 Leucograma	12
5.3 Parâmetros do Exsudato Inflamatório induzido na bexiga natatória	14
6. DISCUSSÃO	16
7. CONCLUSÃO	21
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
9. REFERÊNCIAS	21



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 05038/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Estudo sobre administração exógena de eritropoietina e dexametasona em tilápias do nilo durante septicemia hemolítica induzida por *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 Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de abril de 2014.

Jaboticabal, 02 de abril de 2014.

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

ERITROPOIETINA E DEXAMETASONA EM DANIO RERIO DURANTE AEROCISTITE INDUZIDA POR AEROMONAS HYDROPHILA

RESUMO – O zebrafish representa um importante candidato, apresentando alta homologia genética com seres humanos e respostas, porém, são poucas as informações sobre seus mecanismos eritropoiéticos frente ao e leucopoiéticos. Assim o presente estudo buscou investigar o efeito da administração exógena de eritropoietina e da dexametasona sobre a resposta hematopoiética e leucocitária durante estímulo inflamatório através da indução de aerocistite infecciosa. Para isto, realizou-se indução de aerocistite através de inóculo de *A. hydrophila*, seguida da aplicação por via subcutânea de dexametasona (DEX) na dose de 25µg por unidade animal e 2UI de eritropoietina recombinante humana (EPO), constituindo os seguintes tratamentos: CC+ = não tratada com EPO e não tratada com DEX (n=10); DEX+= não tratada com EPO e tratada com DEX (n=10); EPO+ = tratada com EPO e não tratada com DEX (n=10); EPO/DEX+= tratada com EPO e tratada com DEX (n=10) e PF= (padrão fisiológico) onde os animais não receberam nenhuma medicação e não foi induzido a aerocistite (n=10). para posterior coleta sanguínea e do exsudato inflamatório da bexiga natatória no período de 2 e 4 dias após inoculação (2DPI e 4DPI) e contagem eritrocitária total, contagem de reticulócitos, leucocitária total, diferencial leucocitário e contagem total e diferencial celular do exsudato da bexiga natatória. Na análise dos dados obtidos, observou-se um aumento geral dos parâmetros eritrocitários e de reticulócitos nos grupos EPO+ e DEX+, bem como leucocitários no grupo EPO+, o que indica possível resposta eritropoiética e leucopoiética positiva proveniente do uso da EPO. Na análise leucocitária foi possível observar também significativa redução de valor total, granulócitos, monócitos e linfócitos nos grupos de tratamento com uso de DEX, indicando um presente efeito imunossupressor derivado do uso do glicocorticoide na espécie, demonstrando efeitos similares à mamíferos da EPO e da DEX.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Eritropoiese, *Danio rerio*, inflamação, dexametasona, stress.

ERITROPOETINE AND DEXAMETHASONE IN DANIO RERIO DURING AEROCISTITIS INDUCED BY AEROMONAS HYDROPHILA

ABSTRACT.- Zebrafish represents an important candidate, presenting high genetic homology with humans and answers, however, there is little information about its erythropoietic mechanisms against leukopoietic. Thus the present study sought to investigate the effect of exogenous administration of erythropoietin and dexamethasone on the hematopoietic and leukocyte response during inflammatory stimulation through the induction of infectious aerocystitis. For this, an aerosol induction was performed through *A. hydrophila* inoculum, followed by subcutaneous application of dexamethasone (DEX) at the dose of 25 µg per animal and 2UI of recombinant human erythropoietin (EPO), constituting the following treatments: CC + = untreated with EPO and not treated with DEX (n = 10); DEX + = untreated with EPO and treated with DEX (n = 10); EPO + = treated with EPO and not treated with DEX (n = 10); EPO / DEX + treated with EPO and treated with DEX (n = 10) E And PF = (physiological standard) where the animals received no medication and were not induced to aerocystitis (n = 10), for subsequent blood collection and inflammatory exudate of the swimming bladder at 2 and 4 days after inoculation (2DPI and 4DPI) and total erythrocyte count, reticulocyte count, Total leukocytes, differential leukocytes, and total and differential cell count of the swim bladder exudate. In the analysis of the obtained data, a general increase of erythrocyte and reticulocyte parameters in the EPO + and DEX + groups was observed, as well as leukocytes in the EPO + group, indicating a positive erythropoietic and leukopoietic response from EPO use. In the leukocyte analysis, it was also possible to observe a significant reduction of total value, granulocytes, monocytes and lymphocytes in the treatment groups with DEX, indicating a present immunosuppressive effect derived from glucocorticoid use in the species, demonstrating similar effects to the EPO and DEX mammals.

INDEX TERMS: Erythropoiesis, *Danio rerio*, inflammation, dexamethasone, stress

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Respresentação do delineamento experimental.....	6
Tabela 2 - Resposta de parâmetros eritrocitários observada em zebrafish nos diferentes tratamentos	11
Tabela 3 - Resposta de parâmetros leucocitários observada em zebrafish nos diferentes tratamentos.	13
Tabela 4 - Parâmetros de exsudato inflamatório observada em zebrafish nos diferentes tratamentos.	15

LISTA DE FIGURAS

Figura.1- Aquário para acondicionamento dos peixes.	6
Figura. 2- A: Local da inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> na região dorso lateral esquerdo, ao final do opérculo; B: Evidenciação da bexiga natatória e sua porção cranial e caudal.	7
Figura 3- Fotografia demonstrando o local administração com demonstração (setas vermelhas) dos locais de aplicação da dexametasona: via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda; e da eritropoietina: via subcutânea na região na região dorso-lateral esquerda.	8
Figura 4- Fotomicrografia de uma alíquota de exsudato em câmara de Neubauer, evidenciando as células do esudato.	9
Figura 5- A: secção da cauda; B:obtenção da amostra sanguínea por extravasamento e uso de pipeta; C: contagem de células sanguíneas em câmara de Neubauer. D: Confecção de lâminas com esfregaço sanguíneo para contagem diferencial de células sanguíneas e percentual de reticulócitos.	10
Figura 6 - Fotomicrografia de células eritrocitárias em microscopia óptica no aumento de 100x A: Eritrócitos vistos a partir de esfregaço sanguíneo; B: Reticulócito, com granulações características (seta vermelha)	12
Figura 7 - Fotomicrografia de células leucocitárias (seta vermelha) em microscopia óptica no aumento de 100x A: Linfócito; B: Granulócito.	12

LISTA DE ABREVIATURAS

ICM- Massa celular intermediária
PLM – Mesoderma lateral posterior
HSC – Células tronco hematopoiéticas
EPO – Eritropoietina
GR – Receptor glicocorticóide
GR1– Receptor glicocorticóide tipo 1
GR1– Receptor glicocorticóide tipo 2
Crebio – Centro de Recursos Biológicos e Biologia
NaCl – Cloreto de Potássio
DEX – Dexametasona
GLM – General Linear Modo
g L⁻¹ – Grama por litro
gm.dL⁻¹– Grama por decilitro
DPI – Dias após inóculo
SC – Subcutâneo
Ig – Imunoglobulinas
UFC- Unidades formadoras de colônia
SAS – Statistical Analyses System
TNF- α – Fator de necrose tumoral
YSI – Incorporated in Yellow Springs
EPOR- Receptor de eritropoietina
PCR- Cadeia da polimerase
TSI- Tríplice açúcar ferro
rhEPO- eritropoietina recombinante humana exógena
CFC-E- células formadoras de colônia de eritrócitos
IL- Interleucina

1. INTRODUÇÃO

A busca pelo desenvolvimento de novos compostos químicos retrata uma constante necessidade da realização de testes sobre sua eficácia e potencial tóxicos, assim, cada vez mais a indústria farmacêutica tem buscado alternativas aos modelos experimentais mamíferos utilizados para o desenvolvimento de pesquisas, na tentativa de reduzir custos em sua manutenção e diminuir o tempo necessário para atingir o período ideal de experimentação entre os modelos atuais (MCGRATH & LI, 2008; BOVERHOF & ZACHAREWSKI, 2006; KOLA & LANDIS, 2004). Neste preceito é necessário à busca de modelos experimentais que demonstrem semelhantes respostas fisiológicas aos mecanismos humanos.

O zebrafish (*Danio rerio*) tem mostrado um importante potencial como modelo animal vertebrado para avaliação da toxicidade in vivo de drogas e de triagem para avaliar a eficácia e toxicidade química e segurança, demonstrando semelhantes respostas orgânicas à níveis fisiológicos, celulares e moleculares tendo seus processos metabólicos, processos de sinalização, e comportamento cognitivo assim como sistemas sensoriais comparáveis aos de mamíferos (ZHU et al., 2013; de ESCHE et al., 2012; MCGRATH & LI, 2008). Seu genoma já totalmente sequenciado demonstrou uma homologia de aproximadamente 70% com os genes homólogos humanos, apresentando respostas fisiológicas semelhantes aos de modelos animais mamíferos (MCCOLLUM et al., 2011; RENIER et al., 2007).

Os estudos de compostos voltados às respostas hematopoiéticas apresentam-se de grande importância, demonstrando-se promissores não só na atividade eritrocitárias, mas também na atividade regenerativa frente a estímulos lesivos, desta forma podendo auxiliar em respostas inflamatórias. O uso do zebrafish para a avaliação de respostas sobre a atividade hematopoiética representa uma importante alternativa como modelo animal, exibindo características funcionais e histológicas que corroboram a de humanos (HE et al., 2014; CARROL & NORTH, 2014; HUANG et al., 2013; BUEMI et al., 2009; THISSE & ZON, 2002, BAHARY & ZON, 1998).

Partindo-se da necessidade de se investigar a participação da eritropoietina na resposta hematopoiética e leucocitária na espécie *Danio rerio*, em associação ao efeito glicocorticoide sobre mecanismos de defesa, este estudo tem por objetivos avaliar o efeito da administração exógena de eritropoietina e da atividade glicocorticoide da dexametasona, sobre a resposta hematopoiética e leucocitária durante septicemia hemorrágica com aerocistite induzida por *A. hydrophila*.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivos avaliar o efeito da administração exógena de eritropoietina e da atividade glicocorticoide da dexametasona, administrados via subcutânea e intramuscular (respectivamente), durante septicemia hemorrágica em tilápias do Nilo, *O. niloticus*, com aerocistite induzida por *A. hydrophila*, através da análise da capacidade de recuperação eritrocitária e de formação de reticulócitos, acúmulo celular no exsudato inflamatório, leucograma, atividade respiratória de leucócitos, determinação de atividade de lisozima, bioquímica sérica e histopatologia de órgãos hematopoiéticos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Hematologia em zebrafish

A formação de células sanguíneas são derivadas de células tronco hematopoiéticas, uma célula pluripotente, que através de transcrições gênicas, se proliferam e se diferenciam, torando-as em células sanguíneas, sendo este mecanismo conservado em todos vertebrados (THISSE & ZON, 2002).

A hematopoiese em veterbrados ocorre em forma de ondas durante seu desenvolvimento, pelo qual os sítios de produção celular são alterados de acordo com a fase de seu desenvolvimento. Em mamíferos, o saco vitelino é o primeiro sítio da hematopoiese embrionária. Em peixe-zebra os eritrócitos primitivos surgem exclusivamente a partir da mesoderme lateral posterior (PLM), que mais tarde se torna a massa celular intermediária (ICM). Sobrepondo a essa onda, até 28 horas após fecundação, endotélio hegemônicos na região da aorta, dão origem a células-tronco hematopoiéticas definitivas (HSC) que se tornam o sítio hematopoético até o fim de sua fase embrionária (PIMTONG et. al, 2014).

A formação sanguínea de peixes apresenta-se em seu rim em vida larval e adulto, enquanto que o mamífero, tal formação apresenta-se no fígado fetal e o medula óssea na vida fetal e adulta, respectivamente. O tempo da formação e apresentação das células no sangue depende da taxa relativa de desenvolvimento em cada espécie. Em peixes sua formação e apresentação no sangue ocorre em 24 horas, enquanto que ratos e humanos em 7,5 e 19 dias, respectivamente (THISSE E ZON, 2002; ZON, 1995).

Peixe-zebra são particularmente úteis para a pesquisa de hematologia por conta da elevada conservação de fatores genéticos e de regulação no desenvolvimento sanguíneo, bem como a estrutura e função de tipos de células hematopoiéticas (CARROL & NORTH, 2014; BOATMAN et. al, 2013).

3.2 Eritropoietina

A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoproteico que regula a proliferação e a diferenciação das células eritróides ao interagir com receptores específicos de eritropoietina existentes em diferentes tipos de células (KATZUNG, 2005). Desta forma, este hormônio atua sobre a eritropoiese de modo complexo: estimulando a proliferação de células indiferenciadas medulares, produzindo maior número de mitoses destas células; através da estimulação do amadurecimento das células indiferenciadas de onde surgem os primeiros eritroblastos, denominados proeritroblastos e os eritroblastos basófilos; pela estimulação na síntese da hemoglobina e pelo aumento na taxa de reticulócitos no sangue (LORENZI, 2003).

Nos mamíferos, o fígado é o órgão de produção inicial, após o nascimento o rim assume a função (CHU et al., 2007). A taxa de EPO sintetizada é aumentada nos rins pela hipóxia, levando a níveis elevados de proteínas na circulação periférica. Ao entrar na medula óssea, a EPO uni-se ao seu receptor (EPOR) progenitor das células eritróides, estimulando a proliferação e maturação destas células por ativação dos transdutores Janus-quinase e vias de sinalização de transcrição (NOGAWA-KOSAKA et al., 2009; PAFFETT-LUGASSY et al., 2007).

Paffet-Lugassy et. al (2007) verificaram resposta da eritropoietina sobre a eritropoiese semelhante à humana ao analisarem zebrafish submetidos à hipóxia, demonstrando a corroboração da ação da eritropoietina sobre a hematopoiese dessa espécie.

3.3 *Aeromonas hydrophila*

A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria gram-negativa que afeta uma ampla variedade de espécies de peixe de água doce e ocasionalmente peixes marinhos. Esta bactéria possui citotoxinas, enterotoxinas e um repertório de enzimas que digerem os componestes celulares do hospedeiro, produzindo proteases e hemólises. Vários estudos indicam que a resistência a doenças em peixes está relacionada com sistema imune inato, e que estes parâmetros provavelmente afeta a capacidade inerente do

peixe de resistir a agentes patogénicos antes de uma resposta imune específica (REYES-BECERRIL et al., 2011).

As infecções por *Aeromonas* naturais e experimentais em peixes, anfíbios e répteis estão associados com mudanças hematológicas e histopatológicas. Mas a sua patogênese da infecção ainda não está bem compreendida (BRENDEN & HUIZINGAT, 1986). Em pesquisas Brenden & Huizingat (1986) verificaram que ao inocular *Aeromonas hydrophila* por via intramuscular em ratos de laboratórios, as alterações histológicas, bioquímicas e hematológicas foram observadas 36 horas após infecção. A inoculação levou a septicemia, danos teciduais, choque endotóxico e morte na metade dos animais. O exame histológico revelou: necrose severa do músculo no local da injeção, edema, hemorragia, infiltrado neutrofílico nos pulmões e necrose focal no parênquima hepático. Aumento significativo na aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, bilirrubina e uréia em amostras de sangue. Sugerindo que, a endotoxina contribui para a patogênese da infecção da *Aeromonas* em ratos.

Especula-se que *A. hydrophila* tem o poder de virulência pelas várias enzimas extracelulares que inclui a proteases, hemolisinas, enterotoxinas e acetilcolinesterase, sendo que, algumas destas toxinas têm características bioquímicas. E ainda, as enzimas proteolíticas excretadas por *Aeromonas* spp. Desempenham um papel importante na invasão e estabelecimento da infecção pela superação inicial às defesas dos hospedeiros e pelo fornecimento de nutrientes para a proliferação de células (CASCÓN et al., 2000).

3.4 Anti-inflamatório esteroide

Os glicocorticóides são hormônios esteroides que são secretadas pela glândula suprarrenal após o stress e a um ritmo circadiano. Nos seres humanos e de peixe, o principal glicocorticóide endógeno é o cortisol, enquanto corticosterona é o principal glicocorticóide em roedores. Esses hormônios regulam uma grande variedade de processos, tal como a resposta imune (BARNES, 2006), atividade e comportamento neural (DE KLOET et al., 2005), o metabolismo (WANG, 2005) e a formação de osso (SAMBROOK, 2007).

A principal ação anti-inflamatória dos corticóides está na inativação de múltiplos genes ativos sobre a inflamação, reduzindo assim processos de codificação de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas inflamatórias, receptores e proteínas, promovendo uma modulação sobre a resposta inflamatória e reparação tecidual (BARNES, 2006).

Os efeitos dos glicocorticóides são mediados por um receptor intracelular, o receptor de glicocorticóides (GR). Este receptor é um membro da família dos receptores de esteróides, que por sua vez pertencem à superfamília de receptores nucleares (ZHANG et al., 2004). Como todos os receptores nucleares, GR atua como um fator de transcrição ativado por um ligante, que por sua vez apresenta-se bem conservado entre as espécies de animais vertebrados (BRIDGHAM et al., 2006).

A grande maioria dos peixes teleósteos apresentam dois receptores glicocorticóides, denominados GR1 e GR2 (STOLTE et al, 2006), entretanto o peixe zebra demonstrou a presença de somente um GR (KRUG, 2014; ALSOP & VIJAYAN, 2008; SCHAAF et al, 2008) pelo qual demonstrou-se sob alta indução de expressão com o uso de dexametasona nesta espécie, demonstrando efeitos típicos de glicocorticóide sobre sua resposta inflamatória em neutrófilos e macrófagos, observando as mudanças na sua migração e número e diminuição da expressão de citocinas inflamatórias (YANG et al., 2014; SCHAAF, SCHATZOUPOULOU & SPAINK, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Peixes e acondicionamento

Para a realização do estudo, foram utilizados 90 peixes zebra, oriundas da mesma desova. Os peixes foram acondicionadas em 4 aquários com capacidade de 40L (n=50) (figura 1), abastecidos com água desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano. Após o transporte para os aquários, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade voltem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0 g/L. Receberam ração comercial flocada para peixes ornamentais (32% de proteína bruta), constituindo a dieta basal. O arraçoamento dos animais foi feito duas vezes ao dia, alimentados pela manhã e tarde, correspondendo a 2% da biomassa dos aquários. A qualidade da água determinada nos momentos da alimentação, sendo a temperatura e concentração de oxigênio dissolvido medidos pelo aparelho YSI, modelo 55, e o pH e a condutividade elétrica pelo aparelho YSI, modelo 63.



Figura.1- Aquário para acondicionamento dos peixes.

4.2 Delineamento experimental

Foram constituídos os seguintes tratamentos: EPO+= tratada com EPO (2 UI) e não tratada com DEX (n=10); EPO/DEX+= tratada com EPO (2 UI) e tratada com DEX (25 μ)(n=10); C+= (grupo controle) não tratada com EPO e não tratado com DEX (n=10); DEX+= não tratada com EPO tratada com DEX (25 μ) (n=10), e PF= (padrão fisiológico) onde os animais não receberam nenhuma medicação e não foi induzido a aeroscistite (n=10). Sendo amostrados em dois períodos, isto é: dois e quatro dias pós-inoculação (DPI), para a avaliação da resposta no tempo conforme.

Tabela 1 - Representação do delineamento experimental.

Grupo	Tratamento	DPI ¹		
		0	2	4
EPO+	Inoculado ² + EPO 2UI/Kg	-	N= 10	N= 10
DEX+	Inoculado + Dexametasona 25 μ g	-	N= 10	N= 10
EPO/DEX+	Inoculado + EPO 2UI/Kg + Dexametasona 25 μ g	-	N= 10	N= 10
C+	Inoculado + sem EPO + sem DEX	-	N= 10	N= 10
PF	Padrão fisiológico ³	N=10	-	-

¹ DPI:dias após inoculação

² Induzido reação inflamatória por inóculo de *A. hydrophila*

4.3 Anestesia dos animais

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:1000 diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (Wedemeyer, 1970) para sedação dos animais no momento do desafio bacteriano e administração dos fármacos. A eutanásia dos animais foi realizada a através da submersão em água gelada (abaixo de 4°) de acordo com (Wilson et al 2009).

4.4 Isolamento da bactéria do gênero *Aeromonas hydrophila*

A *Aeromonas hydrophila* foi isolada de peixes naturalmente infectados, com lesões características de aeromonose (POPOFF, 1984). Fornecidas pelo NEPEAM (Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia – FCAV-UNESP/Campus de Jaboticabal. Foram realizados culturas das cepas com posterior plaqueamento seletivo em placas contendo ang vermelho de fenol-amido-ampicilina e ang dextrina-ampicilina.

Das culturas obtidas no plaqueamento seletivo foram colhidas, para cada um dos meios utilizados, até cinco colônias com características sugestivas do gênero *Aeromonas*.

4.5 Preparação do inóculo bacteriano e indução do processo inflamatório

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 Fg/5 minutos, em centrifuga clínica, desprezando-se o sobrenadante e a massa bacteriana (*Aeromonas hydrophila*) precipitada foi diluída em solução salina esterilizada (0,65%), até a obtenção da concentração $6,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL, utilizando-se contagem em placa.

O inóculo foi administrado na bexiga natatória e sua porção cranial (Figura 3).



Figura. 2- A: Local da inoculação de *Aeromonas hydrophila* na região dorso lateral esquerdo, ao final do opérculo; B: Evidenciação da bexiga natatória e sua porção cranial e caudal.

4.6 Administração de dexametasona (DEX) e eritropoietina (EPO)

A aplicação dos diferentes compostos foi realizada imediatamente após a inoculação de *A. hydrophila* nos grupos correspondentes, com administração de dexametasona (Cortvet®), via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda (Figura 4), na dose única de 25 μ e administração de eritropoietina recombinante humana (Hemax-Eritron®) via subcutânea na região na região dorso-lateral esquerda na dose única de 2 UI de acordo com padronização em ensaio piloto.



Figura 3- Fotografia demonstrando o local administração com demonstração (setas vermelhas) dos locais de aplicação da dexametasona: via subcutânea na região caudal-ventral da nadadeira peitoral esquerda; e da eritropoietina: via subcutânea na região na região dorso-lateral esquerda. .

4.7 Avaliação do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória

A avaliação do acúmulo de células totais, ao término dos tempos pré-estabelecidos de dois e quatro dias após a inoculação bacteriana, os animais foram dissecados por um corte longitudinal ventral após anestesia profunda, do ânus ao opérculo; outro do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral dando acesso a bexiga natatória. A seguir, esta foi lavada com 0,01 ml de solução gelada de PBS, contendo EDTA a 0,09%, e então o mesmo volume recolhido e centrifugada a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga clínica. O sobrenadante foi retirado e o sedimento total foi ressuspensionado com a adição de 10 μ L e transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz, coradas pelo método Tavares-dias e Moraes (2003). Para a

contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos foi realizada extensão em lâminas de microscopia colocada uma gota deste exsudato e coradas pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS & MORAES, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz de até 200 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório.

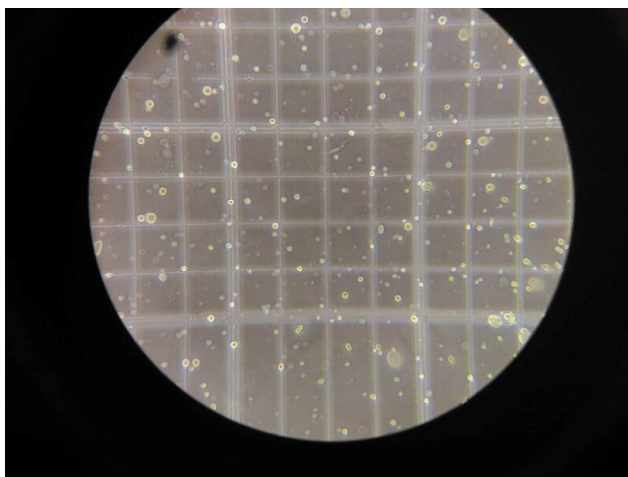


Figura 4- Fotomicrografia de uma alíquota de exsudato em câmara de Neubauer, evidenciando as células do exsudato.

4.8 Avaliação do eritrograma, reticulócitos e contagem total e leucograma

Foram colhidas amostras de sangue por extravasamento através de uma secção transversal da cauda, e coleta do sangue estravasdo através do uso de pipeta previamente heparinizada, e então depositado em eppendorf (Figura 6). A determinação da contagem global de células vermelhas e brancas foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando a solução de Natt e Herrick (1952) com diluente na proporção de 1:100. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sangüíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões pelo método Romanowski (Panótico rápido). Para determinação de reticulócitos, amostras de 1µL de sangue foram incubadas com 1µL de corante de Azul de Cresil brilhante durante 20 minutos mantido em temperatura ambiente, deacordo com técnica modificada (TAVARES-DIAS, 2006). Posteriormente foram confeccionados esfregaços e através de microscopia de luz foram determinado o número de reticulócitos proporcional à contagem de 100 eritrócitos.

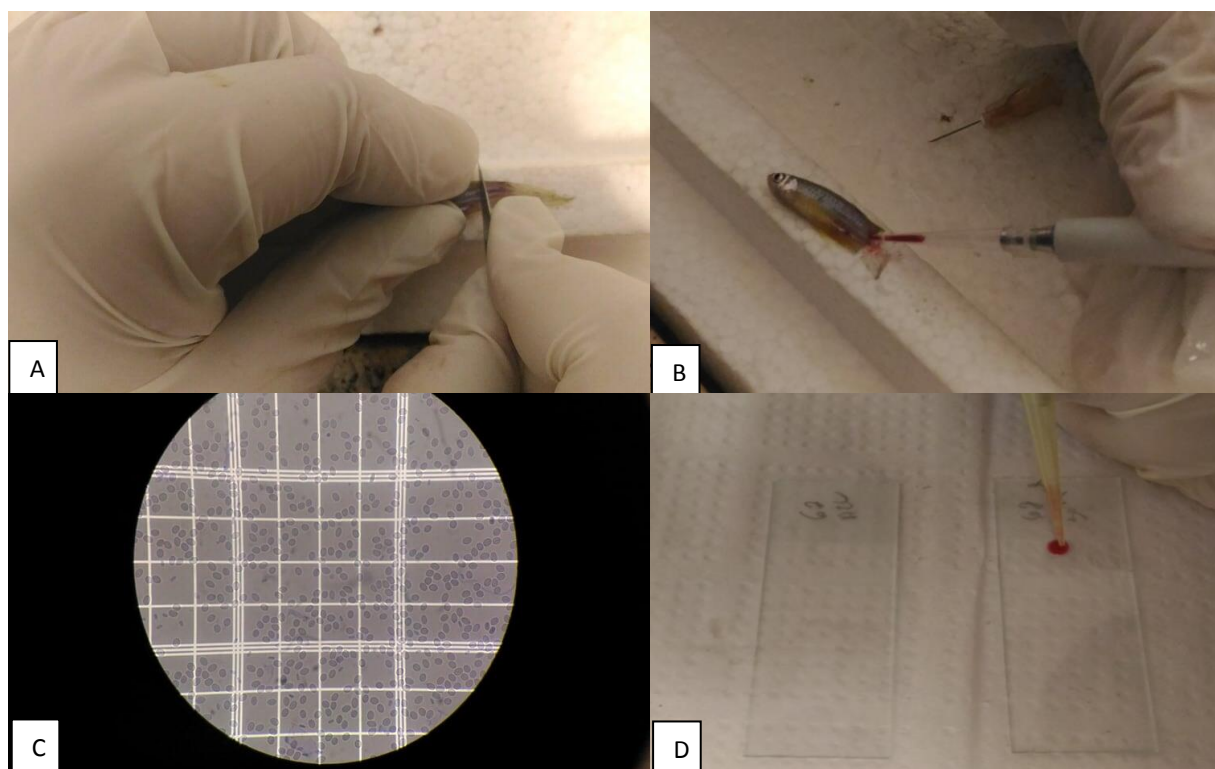


Figura 5- A: secção da cauda; B: obtenção da amostra sanguínea por extravasamento e uso de pipeta; C: contagem de células sanguíneas em câmara de Neubauer. D: Confeção de lâminas com esfregaço sanguíneo para contagem diferencial de células sanguíneas e percentual de reticulócitos.

4.9 Análises estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância através de delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com parcela subdividida no tempo “Split Plot Design” (2 tratamentos com eritropoietina X 2 tratamentos com dexametasona X 2 tempos de coleta), utilizando-se o pacote estatístico SAS, pelo procedimento PROC GLM, versão 8.2. As comparações múltiplas foram aferidas pelo Teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação de parâmetros eritrocitários

Os valores eritrocitários totais evidenciaram diferença entre os grupos e ao longo dos períodos (Tabela 2).

Tabela 2 - Resposta de parâmetros eritrocitários observada em zebrafish nos diferentes tratamentos .

DPD ²	Tratamento ³	Eritrócitos		Reticulócitos	
		10 ⁶		%	
2	EN	14.16 ± 1.60	aA	4.41 ± 0.40	aA
	EG	12.15 ± 1.59	abA	4.64 ± 0.35	aA
	NN	9.60 ± 2.95	bA	1.58 ± 0.51	bA
	NG	10.26 ± 2.28	bA	2.44 ± 0.46	bA
	PF	4.00 ± 0.2	cA	1.71 ± 0.47	bA
4	EN	5.46 ± 1.79	bcB	2.91 ± 0.44	bB
	EG	7.27 ± 3.37	bcB	3.95 ± 0.62	aB
	NN	11.18 ± 2.33	aA	1.07 ± 0.34	cB
	NG	7.87 ± 0.95	bB	1.08 ± 0.09	bB
	PF	4.00 ± 0.2	cA	1.71 ± 0.47	cA
F Value		14.5		21.12	
P > F		< 0.0001		<0.0001	
C.V.		23.1		17.1	

¹ Média seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey. Letras Minúsculas fazem comparação entre os tratamentos e letras maiúsculas entre os tratamentos ao longo do tempo.

² Dias após inoculação da bactéria.

³ C+= Grupo induzido com aeroscistite; EPO+= Grupo induzido aeroscistite e com uso de eritropoetina; DEX+= Grupo induzido aeroscistite e com uso de glicocorticoide EPO/DEX+= Grupo induzido aeroscistite, com uso de eritropoetina e glicocorticoide.

Na análise das médias obtidas entre os diferentes tratamentos dentro do período de 2 DPI, foi possível observar valores superiores dentro dos grupos com uso de eritropoietina EPO+ e EPO/DEX+, sendo dentre eles, o grupo com uso conjunto da EPO com a DEX, enquanto no período de 4 DPI, os valores entre os grupos com uso de EPO e DEX mantiveram-se sem alterações significativas, sendo observado apenas a elevação de valor de eritrócitos totais pelo grupo sem uso de fármacos (C+). Na análise dos valores ao longo dos períodos, observou-se queda da contagem total eritrocitária dentre os grupos com EPO do período 4 DPI em relação ao 2 DPI (Tabela 1).

Na análise dos valores relativos de reticulócitos obtidas entre os diferentes tratamentos dentro do período de 2 DPI, observou-se valores superiores dentro dos grupos com uso de EPO (EPO+ e EPO/DEX+), sendo que o grupo sem uso de fármacos apresentou o menor valor, enquanto no período de 4 DPI, os valores elevados do grupo com EPO+ manteve-se elevado em relação aos outros tratamentos. Ao longo do período, verificou-se a diminuição dos valores de reticulócitos em todos os grupo (Tabela 2).

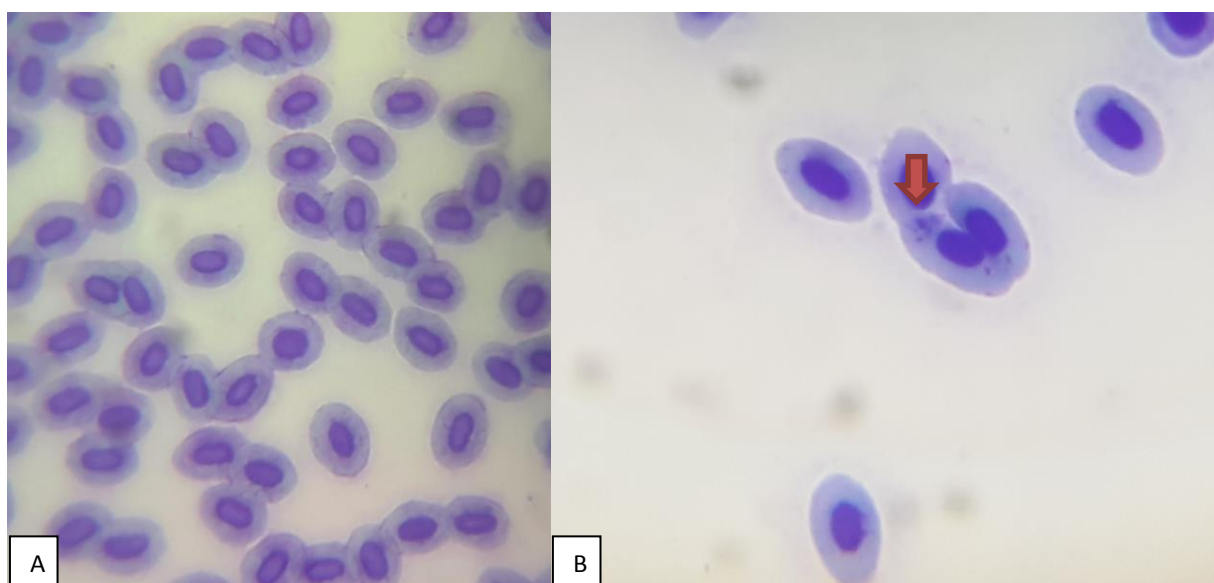


Figura 6 - Fotomicrografia de células eritrocitárias em microscopia óptica no aumento de 100x A: Eritrócitos vistos a partir de esfregaço sanguíneo; B: Reticulócito, com granulações características (seta vermelha)

5.2 Leucograma.

Os valores leucocitários totais evidenciaram diferença entre os grupos e ao longo dos períodos (Tabela 3).

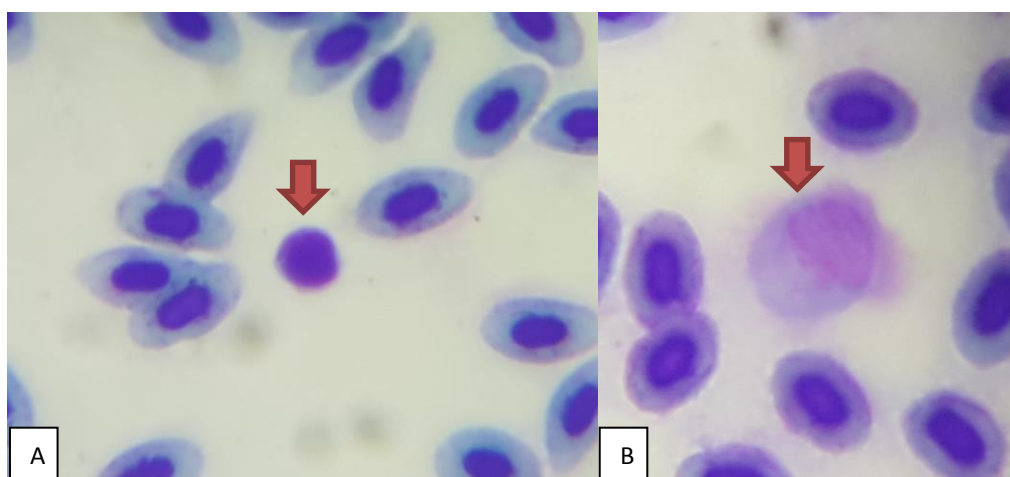


Figura 7 - Fotomicrografia de células leucocitárias (seta vermelha) em microscopia óptica no aumento de 100x A: Linfócito; B: Granulócito.

Tabela 3 - Resposta de parâmetros leucocitários observada em zebrafish nos diferentes tratamentos.

DPD ²	Tratamento ³	Leucócito Total		Granulócitos		Monócitos		Linfócitos	
2	EPO+	21184 ± 1039	aA	5428 ± 1032	aA	358 ± 78	aA	1067 ± 269	aA
	EPO/DEX+	4262 ± 563	bA	1604 ± 448	bA	108 ± 19	bA	63 ± 13	bA
	C+	3370 ± 1683	bB	761 ± 452	bA	492 ± 266	aA	38 ± 13	bA
	DEX+	2614 ± 114	bB	431 ± 141	bB	65 ± 13	bA	110 ± 23	bB
	PF	10818 ± 654	cA	597 ± 84	bA	101 ± 13	bA	182 ± 22	bA
4	EPO+	8634 ± 2292	aB	582 ± 1227	bB	194 ± 100	aB	64 ± 34	bB
	EPO/DEX+	357 ± 186	bB	14 ± 152.8	bB	2 ± 1	aA	107 ± 96	bA
	C+	10432 ± 3514	aA	340 ± 2176	bA	51 ± 39	aB	22 ± 8	bA
	DEX+	11224 ± 4416	aA	3514 ± 5657	aA	172 ± 57	aA	689 ± 190	aA
	PF	10818 ± 654	aA	597 ± 84	bA	101 ± 13	aA	182 ± 22	bA
F Value		11.87		34.71		9.22		54.16	
P > F		< .0001		<.0001		<.0001		<.0001	
C.V.		77.33		55.44		65.64		48.75	

¹ Média seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey. Letras minúsculas fazem comparação entre os tratamentos e letras maiúsculas entre os tratamentos ao longo do tempo.

² Dias após inoculação da bactéria.

³ C+= Grupo induzido com aeroscistite; EPO+= Grupo induzido aeroscistite e com uso de eritropoetina; DEX+= Grupo induzido aeroscistite e com uso de glicorticóide; EPO/DEX+= Grupo induzido aeroscistite, com uso de glicorticóide e eritropoietina; PF= Padrão fisiológico.

A análise dos valores de leucócitos totais no período de 2DPI demonstrou valores reduzidos de leucócitos nos grupos EPO/DEX+ e DEX+ comparação aos outros grupos no período, também evidenciou elevado valor dentro do EPO+ em relação aos outros tratamentos. No período de 4DPI os valores de leucócitos totais dentre os EPO+ e EPO/DEX+ demonstraram-se menores em comparação aos outros grupos, sendo que o grupo DEX+, apresentou valores leucocitários totais elevados em relação aos outros grupos dentro do período. Ao longo dos períodos, os grupos EPO+ e DEX+, apresentaram queda e elevação dos valores, respectivamente, em relação ao período de 4DPI.

A análise de granulócitos, monócitos e linfócitos evidenciou diferença entre os grupos e ao longo dos períodos (Fig 4, 5 e 6). O período de 2DPI, demonstrou valores reduzidos de granulócitos, monócitos e linfócitos nos grupos EPO/DEX+ e DEX+ em comparação aos outros grupos no mesmo período, também evidenciou elevado valor dentro do EPO+ em relação aos outros tratamentos. No período de 4DPI, não houve diferença de valores granulocitários e monocitários entre os grupos dentro do período. Enquanto a análise entre os períodos, evidenciou queda dos valores de granulócitos e monócitos nos grupos EPO+ e C+.

5.3 Parâmetros do Exsudato Inflamatório induzido na bexiga natatória

Os valores de células totais e diferencial encontrados na bexiga natatória, evidenciaram diferença entre os grupos e ao longo do período (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros de exsudato inflamatório observada em zebrafish nos diferentes tratamentos.

DPD ²	Tratamento ³	Células Totais	Granulócitos	Macrófagos	Linfócitos
2	EPO+	5237 ± 1446 ^{cA}	1951 ± 365 ^{bA}	473 ± 104 ^{bA}	982 ± 331 ^{bA}
	EPO/DEX+	44600 ± 5106 ^{aA}	9918 ± 3234 ^{aA}	2951 ± 423 ^{aB}	2166 ± 379 ^{aA}
	C+	25788 ± 6216 ^{bA}	2260 ± 930 ^{bB}	1730 ± 584 ^{abB}	1633 ± 538 ^{abB}
	DEX+	11469 ± 2814 ^{cA}	1381 ± 422 ^{bB}	992 ± 413 ^{bB}	830 ± 385 ^{bA}
4	EPO+	3143 ± 448 ^{cA}	1133 ± 284 ^{cA}	1100 ± 157 ^{cA}	363 ± 142 ^{bA}
	EPO/DEX+	24735 ± 2854 ^{aB}	6092 ± 1561 ^{abB}	8395 ± 999 ^{aA}	2448 ± 618 ^{aA}
	C+	19458 ± 5638 ^{abB}	7321 ± 1460 ^{abB}	8870 ± 2362 ^{aA}	2794 ± 784 ^{aA}
	DEX+	13702 ± 2751 ^{bA}	3993 ± 1671 ^{bcA}	4796 ± 963 ^{bA}	531 ± 180 ^{bA}
F Value		11.95	12.70	13.78	5.60
P > F		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
C.V.		23.62	40.57	31.18	35.52

¹ Média seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey. Letras minúsculas fazem comparação entre os tratamentos e letras maiúsculas entre os tratamentos ao longo do tempo.

² Dias após inculação da aeroscistite.

³ C+= Grupo induzido com aeroscistite; EPO+= Grupo induzido aeroscistite e com uso de eritropoetina; DEX+= Grupo induzido aeroscistite e com uso de glicorticóide; EPO/DEX+= Grupo induzido aeroscistite, com uso de glicorticóide e eritropoetina.

A análise de Leucócitos totais, evidenciou no período de 2DPI valores inferiores no grupo EPO+, comparado aos outros grupos, enquanto os grupos EPO/DEX+ e C+ apresentaram valores superiores aos demais, tal achado se repetiu no período de 4DPI, enquanto ao longo do tempo, todos os grupos tiveram queda em seus valores.

Na análise dos granulócitos, no período de 2DPI, o grupo EPO/DEX+ apresentou valores inferiores, enquanto os demais demonstraram valores igual entre si. Já no período de 4DPI, o grupo EPO/DEX+ continuou a apresentar valores superiores aos demais, enquanto o grupo EPO+, valores inferiores aos demais, sendo os grupos DEX+ e C+ apresentaram valores iguais entre si. Na análise ao longo do tempo, o grupo C+ demonstrou aumento de valor.

Na análise de macrófagos, no período de 2DPI, o grupo C+ apresentou valores superiores aos demais, que apresentaram si sem diferença estatística entre si. No período de 4DPI, os grupos EPO+ e DEX+ apresentaram valores inferiores aos demais, e na análise ao longo do tempo, foi possível verificar aumento de valores no grupo C+.

A avaliação dos linfócitos no período de 2DPI, evidenciou valores inferiores no grupo EPO+, enquanto o grupo EPO/DEX+ demonstrou valores superiores aos demais. No período de 4DPI, o grupo EPO/DEX+ continuou a apresentar valores inferiores aos demais grupos, enquanto o grupo DEX+, apresentou valores inferiores comparados aos grupos C+ e EPO/DEX+. Não houve alteração significativa ao longo do tempo.

6. DISCUSSÃO

A formação de células sanguíneas são derivadas de células tronco hematopoéticas, uma célula pluripotente, que através de transcrições gênicas, se proliferam e se diferenciam, torando-as em células sanguíneas, sendo este mecanismo conservado em todos vertebrados (THISSE & ZON, 2002). Um importante hormônio endógeno nesse processo é a eritropoietina, essencial para a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação terminal células progenitoras denominadas células formadoras de colônia de eritrócitos (CFC-E) (WU et al., 1995). Os valores elevados de eritrócitos totais no período de 2DPI dentre os grupos de tratamento com grupo de EPO, sugerem a ação da eritropoietina recombinante humana exógena (rhEPO), que, embora Chu et al. (2007) em estudo de sequenciamento da EPO do zebrafish tinha mostrado uma compatibilidade de 32% em relação a EPO humana e de 62% da JAK (CHU ET AL., 2008) em relação à humanos, a sinalização da EPO em zebrafish requer, igualmente, a proteína STAT5, demonstrando uma alta preservação da resposta da

EPO junto seu receptor EPOr entre vertebrados (KULKEAW E SUGYAMA, 2012; PAFFET-LUGASY ET AL, 2007).

O tempo da formação e apresentação das células no sangue depende da taxa relativa de desenvolvimento em cada espécie. Em peixes sua formação e apresentação no sangue ocorre em 24 horas, enquanto que ratos e humanos em 7,5 e 19 dias, respectivamente (THISSE E ZON, 2002; ZON, 1995). Os valores de reticulócitos elevados dentre os grupos de tratamento com EPO no período de 2DPI, corroboram com o sugestivo efeito da EPO exógena, uma vez que reticulócitos representam eritrócitos imaturos na fase final de diferenciação, originários de eritroblastos, pelo qual possuem RNA residual, que ao processo de maturação gradualmente se reduzem (FERNANDEZ & GRINDEM, 2000).

Corticosteróides diminuem a sensibilização de eritrócitos por imunoglobulinas do tipo IgG e IgM, diminuindo seu sequestro pelo sistema retículo endotelial (ATINKSON, ET AL 1973), bem como também possui atividade positiva sobre a estimulação de células eritróides progenitoras, promovendo assim um efeito sinérgico a EPO junto às CFC-E (PUTRA ET AL, 2015), elucidando os valores superiores de reticulócitos no grupo de tratamento com EPO em conjunto da DEX no período de 2DPI.

O tempo meia vida EPO recombinante humana em mamíferos quando administrada por via subcutânea se dá em média de 24 horas (JELKMAN, 2013), e a dexametasona de 2,3h (Samtani e Jusko 2005). Embora faltem estudos para o delineamento da farmacocinética da EPO e da DEX no Zebrafish, a não manutenção dos valores eritrocitários totais nos grupos de tratamento com EPO e/ou DEX em relação aos outros no período de 4DPI e queda quando comparado o período 2DPI e 4DPI, sugere que dentro de tal período o efeito estimulador de ambas as drogas, de forma separada ou sinérgica, sobre a eritropoiese reduzidos, porém com ainda presente ação residual de ambas as drogas sobre a estimulação da CFC-E, tal fato, demonstrado pela manutenção de valores elevados de reticulócitos em relação aos tratamentos sem uso de EPO no período de 4DPI, maximizados no grupo com tratamento com uso de EPO e DEX, entretanto quando analisados entre os períodos, observa-se a queda do valores de reticulócitos em todos os grupos.

Os valores eritrocitários dentro dos grupos demonstrarem-se mais elevados que os encontrados em relação ao grupo padrão fisiológico, sugerem uma possível hemoconcentração, uma vez que o grupo PF (padrão fisiológico), os animais não foram submetidos a estímulo inflamatório (indução de aeroscistite). A inflamação apresenta

como uma de suas características o aumento da permeabilidade vascular no sítio inflamatório, o que promove um deslocamento de líquido plasmático para o foco inflamatório (TIZARD, 2014), aumentando assim a proporção de células sanguíneas em razão à diminuição do volume aquoso sérico. Outra hipótese para tal achado seria o desencadeamento de stress aos animais, gerado pelo estímulo inflamatório, proporcionando dor e desconforto, e assim comprometendo seu bem estar (BARTON, 2002), acarretando assim na contração esplênica e desequilíbrio osmótico proveniente da descarga de catecolaminas em conjunto com a ação do cortisol, uma vez que, em peixes o cortisol desempenha função glicocorticóide e mineralocorticóide (CAMPBELL, 2012). Murtha et al (2003), encontrou valores eritrocitários semelhantes em estudo hematológico de zebrafish adulto com o observado dentro do grupo PF (padrão fisiológico), pelo qual não foi submetido a indução de aeroscistite, o indicando assim uma correlação do estímulo inflamatório sobre a concentração de eritrócitos sanguíneos.

A baixa alteração de valores de diferentes leucócitos presentes no exsudato inflamatório ao longo do período, porém, com a diminuição dos valores eritrocitários ao longo do período, reforçam a hipótese do aumento da concentração de eritrócitos em sua contagem diferencial devido ao aumento da permeabilidade vascular exercida durante o período de 2 DPI, indicando o desenvolvimento da resposta inflamatória frente à inoculação de e indução da mesma com o uso a *Aeromonas hydrophila*, o que também é evidenciado pela diminuição do acúmulo celular na bexiga natatória do período de 4DPI em comparação ao período de 2DPI. Em estudo de aeroscistite induzido por Claudiano et al (2013) e Castro et al (2014), encontraram elevado acúmulo celular no exsudato no período 6, 24 e 48 horas após inoculação, com queda de seus valores no período de 48 horas após inoculação, como o observado nesse estudo no período de 2DPI.

Embora o período analisado pós inoculação realizado neste estudo adentre-se ao momento de desenvolvimento de inflamação crônica, ainda foi possível observar ativa presença de granulócitos no exsudato inflamatório no período de 4DPI. Entre os granulócitos, seu principal constituinte se representa pelos neutrófilos, uma das primeiras células a deixar o vaso sanguíneo e migrar para o tecido, atraídos por quimiocinas e mediadores inflamatórios como IL-8 e INF α liberados pelas células endoteliais ativadas, macrófagos e mastócitos, e pelos produtos C3a e C5a do complemento. Em situações onde a inflamação é oriunda de infecção bacteriana,

ocorre ativo recrutamento de neutrófilos para a área atingida, bem como estímulo de sua produção (HOCHBERG et al., 2003). Tal fato se justifica pelo uso de microorganismo vivo no estímulo inflamatório, uma vez que a bactéria viva fornece maior desafio ao sistema imunológico, aumentando o tempo de resposta e evolução da inflamação desenvolvida pela bactéria viva, aporte celular maior e por um período de tempo mais longo para a recuperação dos tecidos atingidos (KUMAR et al., 2010).

A grande maioria dos peixes teleósteos apresentam dois receptores glicocorticóides, denominados GR1 e GR2 (STOLTE et al., 2006), entretanto o peixe zebra demonstrou a presença de somente um GR (KRUG et al. 2014, ALSOP & VIJAYAN 2008, SCHAAF et al 2008) pelo qual apresentou alta indução de expressão com o uso de dexametasona nesta espécie, demonstrando efeitos típicos de glicocorticóide sobre sua resposta inflamatória em neutrófilos e macrófagos, observando as mudanças na sua migração e número e diminuição da expressão de citocinas inflamatórias (YANG et al., 2014; SCHAAF, et al. 2009). Os achados dos valores leucocitário absoluto e seus diferentes constituintes, granulócitos, monócitos e linfócitos, menores nos grupos em que fez o tratamento com uso DEX, corroboram com os achados de imunossupressão frente à administração de glicocorticoide exógeno.

O estudo demonstrou uma clara redução dos valores de leucócitos totais e diferenciais, tanto presentes no sangue, como no exsudato inflamatório no grupo experimental com uso de dexametasona (DEX+), o que aponta a atividade imunossupressora clássica promovido pelos glicocorticoides, que possuem atividade inibitória de múltiplos genes atuantes sobre a resposta imunológica, tais como citocinas que codificam, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas inflamatórias, receptores e proteínas (BARNES, 2006). Os mecanismos de supressão imunológica induzidos pelo corticóide ainda não estão completamente esclarecidos, seus efeitos sobre o sistema imunológico, bem como na leucopoiese, sugerem atuar inibindo as citocinas necessárias para a diferenciação de precursores leucocitárias (GABARDY & CHANDRAKER, 2013, Barnes 2006). Assim, conforme os achados, é altamente sugestivo que as respostas imunológicas de imunossupressão do zebrafish frente ao uso do glicocorticóide dexametasona corrobora com a de mamíferos.

Os resultados apresentaram um efeito anti-inflamatório no grupo EPO+, demonstrado através de seus altos valores leucocitários sanguíneos, combinados com baixa presença de leucócitos quando avaliado o exsudato inflamatório desse grupo em relação aos demais, o que sugere uma baixa migração leucocitária sanguínea para o

foco inflamatório. A estrutura da molécula da EPO apresenta elementos de composição de citocinas pelo qual seu receptor EPO (EPOR) também inclui receptores para tais interleucinas (IL) como IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, ou fator de granulócito / macrófago estimulador de colônias (IHLE, 1995), assim, a eritropoietina vem sendo considerada com um possível efeito estimulatório junto as células pró-genitoras leucocitárias, bem como também, atividade anti-inflamatória, inibindo citocinas próinflamatórias como $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, eNOS (BRINED & CERAMI, 2008, LEE et al, 2006, VILLA et al, 2003).

O $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 β representam duas citocinas de grande importância no desenvolvimento da inflamação, exercendo papel de citocinas próinflamatórias, induzindo respostas clássicas da inflamação como o aumento da permeabilidade vascular no sítio inflamatório e estímulo a quimiotaxia leucocitária e indução a síntese de outras citocinas pró inflamatórias (TIZARD, 2014). Assim, os achados desse estudo demonstraram corroborar com esse fato justificando os elevados valores leucocitários na análise sanguínea, e baixos encontrados na análise do exsudato inflamatório no grupo de tratamento com uso da eritropoietina (EPO+).

Sugere-se também um possível efeito estimulatório da EPO sobre a leucopoiese através do achado de valores leucocitários elevados no grupo EPO. Sela et al. (2001) verificou a presença de EPOR em leucócitos polimorfonucleares e Lisowska et al (2010), a presença em linfócitos T e B, sugerindo possível atividade da EPO sobre a maturação de tais células, como o observado no nesse estudo.

O aumento dos valores leucocitários ao longo dos períodos nos grupos de tratamento com uso de DEX, sugerem a reconstituição da resposta imunológica frente a queda dos níveis plasmáticos da DEX.

Foi observado também um possível efeito negativo sobre o número de leucócitos circulantes sanguíneos ao longo do período no grupo de tratamento com uso conjunto de DEX e EPO (EPO/DEX+), porém o mesmo apresentou valores elevados de células leucocitárias na análise do exsudato inflamatório, sugerindo, que a associação promova um efeito antagônico sobre a resposta inflamatória dentro do grupo. Tal achado também foi encontrado por Gorio et. al (2005), onde ao se utilizar a eritropoietina em conjunto com succinato de metilprednisolona em ratos, após lesão em cordão espinhal, observou intensificação da resposta inflamatória em animais com o uso conjunto da EPO com a metilprednisolona e aumenta da expressão de citocinas próinflamatórias na região lesionada. Assim, como o observado, tal achado sugere que

o uso conjunto de corticoide com a eritropoietina, exerça um efeito inibitório sobre a ação anti-inflamatória exercida por ambos fármacos.

7. CONCLUSÃO

O aumento dos níveis eritrocitários de células maduras e juvenis (reticulócitos), assim como também dos leucócitos totais e suas diferenciações (granulócitos, monócitos e linfócitos) é indicativo que a EPO recombinante humana promoveu efeito estimulatório sobre a eritropoiese, enquanto a redução dos níveis leucocitários nos grupos de tratamento com uso de dexametasona (DEX) sugerem ocorrer resposta imunossupressora frente a corticóide em zebrafish, sendo assim, no presente estudo, observado respostas eritrocitárias frente a eritropoietina (EPO) e imunossupressora frente a DEX semelhantes à ocorrida em humanos.

No presente estudo também foi observado a presença de efeito anti-inflamatório do uso da EPO frente a estímulo inflamatório, porém, inibido quando feito seu uso conjunto a ao glicorticóide Dexametasona, entretanto são necessários maiores estudos para elucidação dos mecanismos de tais achados na espécie.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim, diante deste estudo, salientamos a necessidade de estudos sobre os mecanismos fisiológicos da espécie Zebrafish quanto à resposta frente à administração de eritropoietina exógena, assim buscando explicar vias de ativação e estímulo na resposta encontrada nesse estudo.

9. REFERÊNCIAS

ALSOP, D.; VIJAYAN, M, M. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.294, n.3, p.R711-R719, 2008.

ATKINSON, J. P.; SCHREIBER A. D.; FRANK M.M. Effects of Corticosteroids and Splenectomy on the Immune Clearance and Destruction of Erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v.52, p.1509-1517, 1973.

BAHARY, N.; ZON, L. I. Use of the Zebrafish (*Danio rerio*) to Define Hematopoiesis. **Stem Cells**, v.16, p.89-98, 1998.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **British Journal of Pharmacology**, v.148, p.245-254, 2006.

BOATMAN, S.; BARRET, F.; STATISHCHANDRAN, S.; JING, L.; SHESTOPALOV, I.; ZON, L. I. Assaying hematopoiesis using zebrafish. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.51, p.271-276, 2013.

BOVERHOF, D. R.; ZACHAREWSKI, T. R. Toxicogenomics in Risk Assessment: Applications and Needs. **Toxicological sciences**, v.89, p.352-360, 2006.

BRENDEN, R. A.; HUIZINGAT, H. W. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in mice. **J med. Microbial.** v. 21, p.311-317, 1986.

BRIDGHAM, J. T.; CARROLL, S. M.; THORNTON J. W. Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. **Science**, v. 312, n. 5770, p. 97-101, 2006.

BRINES, M.; CERAMI, A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. **Journal of internal medicine**. v.264, p.405-432, 2008.

BRYL, E.; MYSLIWSKA, J.; DEBSKA-SLIZIEN, A.; RACHON, D.; BULLO, B.; LIZAKOWSKI, S. The influence of recombinant human erythropoietin on tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 production by whole blood cell cultures in hemodialysis patients. **Artificial Organs**, v.22, n.3, p.177-81, 1998.

BUEMI, M.; LACQUANITI, A.; BOLIGNANO, D.; MARICCHIOLO, G.; FAVALORO A.; BUEMI, A. GRASSO G.; DONATO, V.; GIORGIANNI, G.; GENOVESE, L.; COPPOLINO, G.; SFACTORIA, A. The erythropoietin and regenerative medicine: a lesson from fish. **European Journal of Clinical Investigation**, v.39, p.993–999, 2009.

CAMPBELL, T. W. Hematology of Fish. In: THRALL, M. A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2ed, Willey-Blackwell, Oxford, 2012.

CARROL, K. J.; NORTH, T. E. Oceans of opportunity: Exploring vertebrate hematopoiesis in zebrafish. **Experimental Hematology**, v.42, p.684–696, 2014.

CASCÓN, A.; YUGUEROS, J.; TEMPRANO, A.; SÁNCHEZ, M.; HERNANZ, C.; LUENGO, J. M.; NAHARRO, G. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Infection and immunity**. p. 3233–3241, 2000.

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

CEPIKA, A. M.; JUREŠA, D. S.; VERGLES, J. M.; MALENICA, B. Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine treatment. **Cellular Immunology**, v.276, p.196–203, 2012.

CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; MANRIQUE, W. G.; CASTRO, M. P.; LOUREIRO, B. A.; MARCUSO, P. F.; BELO, M. A. A.; JULIETA, R. E.; 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.

ŠANTAK, M.; KAPITANOVIC, S.; MAYER, M.; ANIC, B.; SENTIC ´ F, M.; GAGRO, A.; CHENG-YING C.; CHIA-HSIUNG, C.; GEN-DER, C.; YI-CHUNG, C.; CHIN-CHUN, H.; KAI-YUN, H.; CHANG-JEN, H. The zebrafish erythropoietin: Functional identification and biochemical characterization. **FEBS Letters**, v.581, p.4265–4271, 2007.

DE ESCHE, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, R.; WOUTERSEN, R.; DEGROOT, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: A mini review. **Neurotoxicology and Teratology**, v.34, p.545-55, 2012.

DE KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLSBOER F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v.6, p.463-475, 2005.

FERNANDEZ, F. R.; GRINDEM, C. B. Reticulocyte response, p.110-116.. In: FELDMAN, B. F. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GABARDI, S.; CHANDRAKER, A. Immunosuppressive Pharmacotherapy, p.177-207. In: MAMODE, M.; KANDASWAMY, R. **Abdominal organ trasnplantaion State of art**, 1ed, Oxford:Wiley-Blackwell, 2013.

GORIO, A.; MADASCHI, L.; DI STEFANO, B.; CARELLI, S.; DI GIULIO, A. M.; DE BIASI, S.; COLEMAN, T.; CERAMI, A.; BRINES, M. Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. **PNAS**, v.102, n.45, p.16379-16384, 2005.

HE, J. H.; GAO, J. M.; HUANG, C. J.; LI, C. Q. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, 42:35-42, 2014.

HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J.; SMOLEN, J. S.; WEINBLATT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Rheumatology**. 3. ed. Philadelphia: Mosby, 2003. 484 p.

HONG, W.; XIN, L.; RUDOLF, J.; HARVEY, F. L. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. **Cell**, v.83, p.59-67, 1995.

HUANG, C. C.; MONTE, A.; COOK, J. M.; KABIR, M. S.; PETRSON, P. P. Zebrafish Heart Failure Models for the Evaluation of Chemical Probes and Drugs. **Assay and Drug Development Technologies**, v.11, p.561-572, 2013.

IHLE, J. N. Cytokine receptor signaling. **Nature**. v.377, p.91-594, 1995.

JELKMAN, W. Physiology and Pharmacology of Erythropoietin. **Transfusion Medicine and Hemotherapeutical**, v.40, p.302–309, 2013.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: Básica & Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p.711-715, 2004.

KRUG, R. G.; POSHUSTA, T. L.; SKUSTER, K. J.; BERG, M. R.; GARDNER, S. L.; CLARK, K. J. A transgenic zebrafish model for monitoring glucocorticoid receptor activity. **Genes, Brain and Behavior**, v.13, n.5, p.478-487, 2014.

KULKEAW, K.; SUGIYAMA, D. Zebrafish erythropoiesis and the utility of fish as models of anemia. **Stem Cell Research & Therapy**, v.3, p.55-65, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. ; ASTER, J. C. Robbins e Contran **Patologia Bases patológicas das doenças**. 8. ed, 2010. 1548 p.

LEE, S-T.; CHU, K.; SINN, D-I.; JUNG, K-H.; KIM, E-H.; KIM, S-J.; KIM, J-M.; KO- S-Y.; KIM, M.; ROH, J-K. Erythropoietin reduces perihematoma inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage. **Journal of Neurochemistry**, v.96, p.1728–1739, 2006.

LISOWSKA, K. A.; DE ŁBSKA-SŁIZIEN, A.; BRYL, E.; RUTKOWSKI, B.; WITKOWSKI, J. M. Erythropoietin Receptor Is Expressed on Human Peripheral Blood T and B Lymphocytes and Monocytes and Is Modulated by Recombinant Human Erythropoietin Treatment. **Artificial Organs and Transplantation**, v.34, n.8, p.654–662, 2010.

LORENZI, T. F. Hemopoese. Origem das Células do Sangue. Citologia das células do sangue e órgãos hemoformadores, p1-44. In: Ibid. (Eds). **Manual de Hematologia: Propedeutica e Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

MASTERS, F. B. Fármacos usados na anemia, fatores de crescimento hematopoiético, p581-600. In: Katzung B.G, Masters S.B., Trevor A.J. **Farmacologia: Básica & Clínica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

MCCOLLUM, C. W.; DUCHARME, N. A.; BONDESSON, M.; GUSTAFSSON, J. A. Developmental Toxicity Screening in Zebrafish. **Birth Defects Research**, v.93, p.67-114, 2011.

MCGRATH, P.; LI, C-K. ZEBRAFISH: A predictive model assessing drug- induced toxicity. **Drug discovery today**, v.13, p.394-401, 2008.

MURTHA, J. M.; QI, W.; KELLER, E. T. Hematologic and Serum Biochemical Values for Zebrafish (Danio rerio). **Comparative Medicine**. v.53, n.1, p.37-41, 2003.

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

NOGAWA-KOSAKA, N.; HIROSE, T.; KOSAKA, N.; AIZAWA, Y.; NAGASAWA, K.; UEHARA, N.; MIYAZAKI, H.; KOMATSU, N.; KATO, T. Structural and biological properties of erythropoietin in *Xenopus laevis*. **Experimental Hematology**, v.38, p.363–372, 2010.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K; VALDEZ, P.A; HYMOWITZ, S. G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annu. Rev. Immunol**, v.29, p.71–109, 2011.

PAFFETT-LUGASSY, N.; HSIA, N.; FRAENKEL, P. G.; PAW, B.; LESHINSKY, I.; BARUT, B.; BAHARY, N.; CARO, J.; HANDIN, R.; ZON, L. I. Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish. **Blood**. v.110, p.2718-2726, 2007.

PIMTONG, W.; DATTA, M.; ULRICH, A. M.; RHODES, J. Drl.3governs primitive hematopoiesis in zebrafish. **Nature Scientific Reports**, v. 4, 2014.

PUTRA, W. K; SOEWONDO, A; RIFA, M. Expression of Erythroid Progenitor Cells and Erythrocytes on Dexamethasone Induced-Mice. **Journal Biotropika**, v.3, n.1, p.42-45, 2015.

RENIER, C.; FARACO, J. H.; BOURGIN, P.; MOTLEY, T.; BONAVENTURE, P.; ROSA, F.; MIGNOT, E. Genomic and functional conservation of sedative-hypnotic targets in the zebrafish. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.17, p.237-253, 2007.

REYES-BECERRIL, M.; LÓPEZ-MEDINA, T.; ASCENCIO-VALLE, F.; ESTEBAN, M. A. Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.31, p.564-570, 2011.

SAMBROOK, P. N. Anabolic therapy in glucocorticoid-induced osteoporosis. **The New England journal of medicine**, v.357, n.20, p.2084, 2007.

SAMTANI, M. N.; JUSKO, W. J. Comparison of Dexamethasone Pharmacokinetics in Female Rats after Intravenous and Intramuscular Administration. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.26, p.85–91, 2005.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v.10, n.170-181, 2010.

SCHAAF, M. J. M.; CHATZOPOULOU, A.; SPAINK, H. P. The zebrafish as a model system for glucocorticoid receptor research. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.153, n.1, p.75-82, 2009.

SCHAAF, M. J.; CHAMPAGNE, D.; LAANEN, I. H. C.; WIJK, D. C. W. A.; MEIJER, A. H.; MEIJER, O. C.; SPAINK, H. P.; RICHARDSON, M. K. Discovery of a functional glucocorticoid receptor β -isoform in zebrafish. **Endocrinology**, v.149, n.4, p.1591-1599, 2008.

SELA, S.; SHURTZ-SWIRSKI, R.; SHARON, R.; MANASTER, J.; CHEZAR, J.; SHKOLNIK, G.; SHAPIRO, G.; SHASHA, S. M.; MERCHAV, S.; KRISTAL, B. The Polymorphonuclear Leukocyte –A New Target for Erythropoietin. **Nephron**, v.88, p.205–21, 2001.

STOLTE, E. H.; MAZON, A. F.; LEON-KOOSTERZIEL, K. M.; JESIAK, M.; BURY, N. R.; STURM, A.; SAVELKOUL, H. F. J.; VERBURGVANKEMENADE, B. M. L.; FLIK, G. Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. **Journal of Endocrinology**, v.198, n.2, p.403-417, 2008.

TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater. **Journal of fish biology**, v.68, p.1822-1833, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. p 18-19. Villimpress complexo gráfico. Ribeirão Preto. 2004.

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

TIZARD, I. R. Sinalização Celular: Citocinas e seus Receptores. In: TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 9ed, Elsevier, São Paulo, 2014.

TRIFUNOVIĆ, J.; MILLER, L.; DEBELJAK, Z.; HORVAT, V. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. **Biochemia Medica**, v.25, n.1, p.36–48, 2015.

THISSE, Z.; ZON, L. I. Organogenesis-Heart and Blood Formation from the Zebrafish Point of view. **Science**, v.295, p.457-462, 2002.

VILLA, P.; BIGINI, P.; MENNINI, T.; AGNELLO, T.; LARAGIONE, T.; CAGNOTO, A.; VIVIANE, B.; MARINOVICH, M.; CERAMI, A.; COLEMAN, T. R.; BRINES, M.; GHEZZI, P. Erythropoietin Selectively Attenuates Cytokine Production and Inflammation in

Cerebral Ischemia by Targeting Neuronal Apoptosis. **Journal of experimental medicine**. v.6, p.971-975, 2003.

WANG, M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the metabolic syndrome. **Nutrition Metabolic**, v.2, n.3, p.1-14, 2005.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Fisher. Res. Board Can.** v.22, n.5, 1970.

WILSON, J. M.; BUNTE, R. M.; CARTY, A. J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science** v.48, n.6, p785-789, 2008.

ZHU, J. J.; XU, I. Q.; JE, J. H.; YU, H. P.; HUAN, G. C. J.; GAO, J. M.; DONG, K. X.; XUAN, Y. X.; LI, C. Q. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. **Journal of Applied Toxicology**, v.34, p.139-148, 2013.

ZON, L. I. Developmental Biology of Hematopoiesis. **Blood**, v.86, p.2876-2891, 1995.

YANG, L. L.; WANG, G. Q.; YANG, L. M.; ZHANG, W. Q.; YU, L. Z. Endotoxin molecule lipopolysaccharide-induced zebrafish inflammation model: a novel screening method for anti-inflammatory drugs. **Molecules**, v.19, n.2, p.2390-2409, 2014.